

**ETUDE DE LA REGULATION
DU METABOLISME FERMENTAIRE
chez
SACCHAROMYCES CEREVISIÆ**

par
Charles A. MASSCHELEIN

Mémoire présenté pour l'obtention du grade d'Ingénieur-Docteur.

Soutenu le 27 avril 1965 devant la Commission d'Examen.

MM. URION - Président
BARRIOL - Membre
GAY - Membre (rapporteur)

**ETUDE DE LA REGULATION
DU METABOLISME FERMENTAIRE
chez
SACCHAROMYCES CEREVISIÆ**

par
Charles A. MASSCHELEIN



Mémoire présenté pour l'obtention du grade d'Ingénieur-Docteur.

Soutenu le 27 avril 1965 devant la Commission d'Examen.

MM. URION - Président
BARRIOL - Membre
GAY - Membre (rapporteur)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551920_0023

Doyen : M. AUBRY

1er Assesseur : M. GAY

Doyens honoraires : MM. CORNUBERT, DELSARTE, URION,
ROUBAULT.

Professeurs honoraires: MM. CROZE, RAYBAUD, LAFFITE,
LERAY, JOLY, LAPORTE, EICHHORN,
CAPELLE, GODEMENT, DUBREIL,
L. SCHWARTZ, DIEUDONNE, de
MALLEMANN, LONGCHAMBON, LE-
TORT, DODE, GAUTHIER, GOUDET,
OLMER, CORNUBERT, CHAPELLE,
GUERIN, CHEVALLIER, WAHL.

Maître de Conférences honoraire : M. LIENHART.

Professeurs :

MM.

URION	Chimie biologique	DUVAL	Chimie
DELSARTE	Analyse supérieure	COPPENS	Radiogéologie
ROUBAULT	Géologie	FRUHLING	Physique
VEILLET	Biologie animale	SUHNER	Physique expérimentale
ECHEVIN	Botanique	HILLY	Géologie
BARRIOL	Chimie théorique	LE GOFF	Génie chimique
BIZETTE	Physique	CHAPON	Chimie biologique
GUILLIEN	Electronique	HEROLD	Chimie industrielle
GIBERT	Chimie physique	SCHWARTZ	Exploit. minière
LEGBAS	Mécanique rationnelle	GAYET	Physiologie
BOLFA	Minéralogie	MANGENOT	Phytopathologie
NICLAUSE	Chimie	MALAPRADE	Chimie
FAIVRE	Physique appliquée	HADNI	Physique
AUBRY	Chimie minérale	BONVALET	Mécanique physique
		Mme ROIZEN	Physique

MM.

KERN	Minéralogie	CERF	M.M.P.
BASTICK	Chimie	CHAMPIER	Physique
DUCHAUFOR	Pédologie	REGNIER	Physico-Chimie
NEEL	Chimie ind. organ.	GAY	Chimie biologique
GARNIER	Agronomie	STEPHAN	Zoologie
WEPPE	Minéralogie appl.	N.	Calcul Diff. et intégr.
BERNARD	Géologie appliquée	LEINSALES	Chimie organique.

Maîtres de Conférences et Professeurs sans chaire :

MM.

WERNER	Botanique	FRENTZ	Biologie animale
CONDE	Zoologie	Mme HERVE	Math.(propédeutique)
GOSSE	Génie chimique	AUROUZE	Géologie
ROCCI	Géologie	MARI	Chimie (I.S.I.N.)
VUILLAUME	Psychophysiologie	LAFON	Physique (I.S.I.N.)
PLAN	Mécanique phys.	FELDEN	Phys. théor. nucl.
Mme BASTICK	Chimie M.P.C. (Epinal)	FLECHON	Phys. M.P.C. (Epinal)
GUDEFIN	Physique	N.	Math. S.P.C.N.
HORN	Physique		

Secrétaire Principal : M.C. Caron

Que Monsieur le Professeur URION, Doyen Honoraire de la Faculté des Sciences et Directeur de l'Ecole Supérieure De Brasserie et de Malterie, soit assuré de notre profonde reconnaissance pour nous avoir autorisé à présenter cette thèse et pour avoir bien voulu accepter la présidence du jury.

Nous remercions Monsieur le Professeur GAY, de l'intérêt qu'il a bien voulu accorder à ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à tout le personnel du service de fermentations du C.E.R.I.A. et particulièrement à Madame Ramos-Jeunehomme, pour sa collaboration précieuse.

Nous tenons également à exprimer notre vive gratitude envers la direction du C.E.R.I.A. et les autorités administratives de la Province de Brabant.

PLAN GENERAL DU TRAVAIL

	<u>Page</u>
INTRODUCTION GENERALE	5
OBJET DU TRAVAIL	20
MATERIEL ET TECHNIQUES	22
 <u>CHAPITRE I:</u> * Etude de la REGULATION de la FERMENTATION du MALTOSE et du MALTOTRIO SE chez <i>S.cerevisiae</i> et <i>S. carlsbergensis</i>	 29
Etude de la Fermentation du Maltose	30
Etude de la Fermentation du Maltotriose	36
Caractérisation biochimique de deux cultures monospores issues des souches 106 et 173.	38
Etude de la Régulation de la Fermentation du Maltose par le Glucose	41
Conclusions	53
 <u>CHAPITRE II:</u> * CONTROLE METABOLIQUE de la SYNTHÈSE DE L' GLU- COSIDASE chez <i>S.CEREVISIAE</i>	 60
Dosage de l' α glucosidase	61
Etude du contrôle de la synthèse de l' α glucosi- dase par le glucose	71
Conclusions	80
 <u>CHAPITRE III:</u> * ETUDE de la REGULATION du METABOLISME FERMENTAIRE en ABSENCE de MULTIPLICATION CELLULAIRE	 86

	<u>Page</u>
Introduction	86
Variations du Métabolisme Fermentaire au cours du cycle de la croissance en anaérobiose	87
Variations du Métabolisme Fermentaire au cours de la Phase de Latence	88
Variations du Métabolisme Fermentaire au cours de la croissance anaérobie en présence d'actidione	92
Variations du Métabolisme Fermentaire en absence d'une source d'Azote	94
Influence des acides aminés sur la réversibilité de la perte de la capacité fermentaire	108
Variations Enzymatiques dans le Métabolisme Fermentaire	114
I. Hexokinase	116
II. Aldolase	121
III. α Glucosidase	126
Conclusions	129
 <u>DISCUSSION GENERALE et</u> <u>CONCLUSIONS</u>	 136
 <u>RESUME</u>	 149
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	 151

* Chaque chapitre comprend un plan détaillé.

A B B R E V I A T I O N S

ADN	-	acide désoxyribonucléique
ARN	-	acide ribonucléique
mARN	-	acide ribonucléique messenger
sARN	-	acide ribonucléique de transfert
ADP	-	acide adényldiphosphorique
ATP	-	acide adényltriposphorique
EDTA	-	versène
EMP	-	EMBDEN, MYERHOF, PARNAS
F.6.P	-	fructose - 6 - phosphate
NAD-NADH ₂	-	nicotinamide adénine dinucléotide forme oxydée et forme réduite
PFK	-	phosphofructokinase
poly U	-	acide polyuridylique
poly A	-	acide polyadénylique
W.D.	-	WARBURG - DICKENS

INTRODUCTION GENERALE

L'application industrielle de la levure dans les industries de fermentation, a donné une impulsion décisive à l'étude des transformations biochimiques intervenant au cours du métabolisme anaérobie.

La purification et la cristallisation de plusieurs enzymes a permis de préciser certains aspects fondamentaux de la glycolyse fermentaire et d'élaborer un schéma d'ensemble connu sous le nom de EMBDEN, MEYERHOF et PARNAS. (EMP)

Chez la levure le chemin glycolytique peut être considéré comme la seule voie de dégradation des hydrates de carbone en anaérobiose.

La fonction biosynthétique et énergétique de ce processus catabolique présente non seulement un intérêt fondamental évident mais présente également un intérêt technique considérable dans de nombreuses industries biochimiques et plus spécialement en brasserie.

La fermentation discontinue ou fermentation par cycle reste, nonobstant le développement de nouveaux procédés de fermentation en continue, un système parfaitement adapté aux besoins de la brasserie moderne.

Ses chances de survie sont élevées étant donné sa simplicité et en plus sa grande souplesse aussi bien au point de vue rythme de la production qu'au point de vue qualité du produit que l'on veut obtenir.

Notons toutefois que ces avantages sont quelque peu atténués par le fait que la discontinuité du processus entraîne inévitablement une certaine irrégularité de la qualité de la bière. Bien plus la dégénérescence qui se caractérise principalement par un ralentissement de la vitesse de fermentation

et par des écarts de plus en plus importants entre l'atténuation limite et l'atténuation obtenue fin garde, peut également être considérée comme une conséquence de la discontinuité de la fermentation classique.

En effet, le déterminisme héréditaire du caractère "dégénéré" apparaît comme peu probable. L'origine de la dégénérescence serait plutôt à attribuer aux variations non héréditaires s'exprimant comme autant de réponses spécifiques à des variations de la composition du milieu ou de l'état physiologique de la levure.

Il suffit bien souvent de changer la composition du moût pour obtenir une fermentation normale avec une levure "dégénérée" ce qui démontre amplement la réversibilité du phénomène.

La dégénérescence est un terme mal défini et a fait l'objet de nombreux travaux.

KLEBER et HOFFMAN (77) étudient le rôle de la température, une valeur trop élevée provoquerait la perte du pouvoir atténuant de la levure.

CURTIS (24) envisage la possibilité d'une floculation mutuelle entre deux types de levures.

BARTON WRIGHT (2) explique les variations de l'atténuation par une fermentation plus ou moins complète des maltotrioses.

LINDEGREN (81) met l'accent sur l'apparition spontanée de mutants cytoplasmiques à déficience respiratoire.

WINDISCH (163) attribue les causes du phénomène à des variations du milieu et à la ségrégation d'un certain nombre de caractères par sporulation suivie de sélection.

ROHRER (126) définit la dégénérescence comme un phénomène essentiellement irréversible, qu'il attribue à des muta-

tions induites ou spontanées.

En conclusion la dégénérescence pourrait être considérée comme l'aboutissement d'une évolution lente d'un ensemble de caractéristiques métaboliques. Parmi celles-ci la vitesse de fermentation semble le paramètre le plus tangible en vue d'une étude approfondie du phénomène.

Chaque fermentation industrielle comporte essentiellement trois phases: une phase de latence, une phase exponentielle de croissance et une phase stationnaire.

Chacune de ces phases est caractérisée par des phénomènes de régulation dont la nature dépendra soit de la composition hydrocarbonée du milieu soit de l'état physiologique de la levure.

La composition hydrocarbonée du moût est actuellement bien établie suite aux travaux de McFARLANE (91) GJERTSEN (38) HALL (46).

Le tableau suivant donne la composition glucidique d'un moût de brasserie.

composition hydrocarbonée	teneur en gr% gr de matière sèche
fructose et glucose	8,2
saccharose	4,2
maltose	41,7
maltotriose	14,2
maltotetraose	5,8
dextrines	15,2
hydrates de carbone totaux	89,3
hydrates de carbone non fermentescibles	21,0
hydrates de carbone fermentescibles	68,3

Les sucres forment environ 90% de l'extrait total et se composent de fructose, glucose, saccharose, maltose, maltotrioses et différents sucres de complexité croissante.

Le mono-di et trisaccharides sont fermentescibles et forment 70% des hydrates de carbone du moût.

Nous savons que seuls les monosaccharides sont des substrats directs pour l'hexokinase et les autres enzymes de la glycolyse fermentaire. Notons toutefois que le saccharose est fermenté en même temps que le glucose et le fructose puisque la paroi cellulaire contient de l'invertase qui permet l'hydrolyse de ce disaccharide avant son transport au travers de la membrane cytoplasmique. (12, 33, 25, 146). La fermentation du maltose et du maltotriose nécessite l'intervention de certains enzymes permettant le transport et l'hydrolyse de ces sucres.

La plupart des levures de brasserie possèdent deux mécanismes permettant le transport et l'hydrolyse de ces sucres au travers de la membrane cellulaire notamment la diffusion facilitée et le transport actif. La diffusion facilitée serait de nature enzymatique et permettrait une diffusion plus rapide des sucres que celle basée sur une simple diffusion. (15) Un certain nombre d'arguments semblent en faveur de cette hypothèse.

SOLS (135) montre une inhibition de la fermentation du glucose par le desoxy glucose qui s'avère sans effet sur l'activité de l'hexokinase et sur la fermentation en extrait.

D'autre part, BLAKELEY et BOYER (5) arrivent à la même conclusion en utilisant le 6 fluoro- 6 desoxyglucose. Signalons encore les résultats de CIRILLO (16) et BURGER (13) qui montrent que le glucose inhibe le transport des sucres non fermentescibles par la levure comme le sorbose, le xylose et le galactose. L'ensemble de ces résultats semble confirmer l'existence d'un système de transport spécifique du glucose qui fonctionnerait indépendamment de l'hexokinase.

Le second mécanisme nécessite de l'énergie et se caractérise par une concentration du sucre dans la cellule par rapport au milieu. (17) Ces effets de concentration ont été démontrés dans le cas du maltose et du maltotriose pour un certain nombre de souches de *S. Cerevisiae*. (26, 56, 57, 125) Le nom de perméases a été donné à ces mécanismes de transport actif. Ainsi au cours de l'induction leur synthèse est inhibée par les analogues des acides aminés comme la p. fluoro-phenylalanine et la β -2-thienylalanine. (47)

Notons également qu'il existe des mécanismes de transport spécifiques pour le maltose et le maltotriose. (56) Certaines souches quoique fermentant ces deux sucres "in vitro" s'avèrent cryptiques par rapport au maltotriose "in vivo".

Les hexoses sont fermentés constitutivement, c'est-à-dire indépendamment de la composition carbonée du milieu de culture.

Par contre, le maltose et le maltotriose ne sont utilisés à une vitesse appréciable qu'après croissance préalable sur un de ces deux sucres.

Un grand nombre de travaux ont été consacrés à l'étude de la synthèse induite de l' α glucosidase chez la levure. (48, 67, 138, 152) HALVORSON et ELLIAS (49) ont étudié les propriétés et les conditions de purification d'une glucosidase produite par le gène M chez *Saccharomyces Italicus*. L'enzyme hydrolyse un grand nombre de - d - glucosides tout en présentant une spécificité élevée pour les holosides.

WINGE et ROBERTS (165) ont étudié les gènes responsables de l'utilisation du maltose chez *Saccharomyces*.

L'analyse génétique révèle la présence d'au moins six gènes non liés. (M_1 ; M_2 ; M_3 ; M_4 ; M_5 ; M_6) Le gène M_4 est apparu par mutation spontanée et également après irradiation. (166) M_5 a été isolé par Gilliland (36,37) chez *Saccharomyces Carlsbergensis*. Le gène M présent chez *Saccharomyces Italicus* (168) ainsi que

les gènes $M A_1$ de HAWTHORNE et $M A$ de LINDEGREN (169) ont été identifiés comme étant identiques au gène M_1 .

HALVORSON, WINDERMAN et GORMAN (50) ont montré que les α glucosidases produites par les cinq gènes M non allèles se caractérisent par des propriétés semblables. (charge, adsorption, thermostabilité, spécificité de substrat et sérologique) Il ressort de ces résultats que les protéines formées par ces différents gènes se caractériseraient par la même séquence en acides aminés et par la même structure tertiaire. Ceci impliquerait également des structures homologues de l'ADN sur les différents chromosomes.

Récemment JACOB et MONOD (38) ont décrit deux types de gènes de régulation. Un gène opérateur qui détermine l'activité d'un ensemble de gènes de structure situés sur le même chromosome (opéron) et un gène régulateur qui contrôle soit la perméabilité par rapport à l'inducteur soit la formation de répresseurs. Les résultats obtenus par HALVORSON et COLL. permettent de considérer les gènes M comme des gènes de structure. Tout d'abord assimiler les 5 gènes M_1 à des gènes opérateur serait admettre implicitement l'existence de cinq gènes de structure.

D'autre part, le fait qu'à l'état récessif, les cellules ne présentent aucune activité hydrolytique et qu'à l'état dominant la présence d'un ou de plusieurs gènes M_1 suffit pour produire des quantités appréciables d' α glucosidase permet d'éliminer l'hypothèse que les gènes M_1 seraient des gènes régulateur.

Notons toutefois qu'à l'état dominant le système est inductible et que dans un diploïde hétérozygote l'inductibilité est un caractère dominant. Ces arguments seraient donc en faveur de l'existence de gènes régulateur additionnels.

Le contrôle de la synthèse d'un enzyme par plusieurs gènes identiques chez la levure ne se limite pas au cas de l' α glucosidase.

En effet, la fermentation du raffinose du saccharose (170) et de l' α méthylglucoside (62,153) se trouve également contrôlée par des gènes multiples.

Il ressort de la comparaison de diploïdes homzygotes et hétérozygotes pour les différents gènes M que le taux différentiel de synthèse est directement proportionnel au nombre de gènes.

Pour des cellules induites la teneur en α glucosidase dépend quantitativement du gène de structure. En plus la présence des gènes M G et Ma₁ influence la formation de l' α glucosidase. Ainsi RUDERT et HALVORSON (128) émettent l'hypothèse que chaque gène M se trouverait sous contrôle d'un gène opérateur. Chacun de ces gènes opérateur présenterait alors une affinité différente pour un métabolite répresseur commun.

L'accumulation de gènes additionnels chez la levure pourrait présenter un certain avantage industriel. Il faut toutefois tenir compte du fait que la régulation de la vitesse d'utilisation du maltose est déterminée par des perméases qui pourraient également constituer un facteur limitant de l'activité fermentaire de la levure au cours d'une fermentation industrielle.

Un certain nombre d'arguments ont récemment été avancés par EMEIS et WINDISCH (29) en faveur de la polyploïde des levures de brasserie. Ces auteurs ont comparé les rapports de ségrégation des caractères α et α d'un nombre de souches industrielles avec des souches de degré de ploïde connu. Les rapports de ségrégation trouvés semblent indiquer que la plupart des souches industrielles sont polyploïdes.

Le fait qu'après isolement on trouve des cultures monospores incapables de copuler mais formant à leur tour des spores, semble en faveur de cette hypothèse. Les difficultés de sporulation suggèrent souvent une ploïde impaire. En effet, dans ce cas lors de la meiose, on ne peut obtenir un chiffre entier

en divisant le nombre de chromosomes par deux. Dans ce cas, on obtient en partie des spores diploïdes et en partie des spores haploïdes. Ces anomalies se constatent aussi bien lors de la formation des spores que lors de la germination.

Ces quelques considérations soulignent la complexité génétique des levures de brasserie et aussi la difficulté d'interprétation des phénomènes d'induction et de répression qui en résultent.

L'interaction entre l'ADN, l'ARN et les protéines forme la base même de ces mécanismes de contrôle.

Les travaux de GROS et COLL. (1961) (43) de BRENNER et COLL. (1961) (9) et de JACOB et MONOD (1961) (69) ont montré que le site cellulaire de la synthèse protéique, les ribosomes ne contiennent par l'information nécessaire à cette synthèse.

L'information génétique ainsi que le code de synthèse est porté par un ARN messager (9,43) dont la composition en bases est complémentaire à celle du ADN. (35,34) Son mécanisme de synthèse serait analogue à celui de la réplication de l'ADN. (160,161)

L'utilisation de polynucléotides synthétiques (10, 105, 118, 119) (poly U et poly A) a permis de réaliser des incorporations d'acides aminés in vitro et d'établir une relation entre la structure de l'ARN messager et celle du peptide formé.

C'est finalement la coordination des codes de l'ARN messager et de l'ARN de transfert qui déterminera la séquence en acides aminés de la nouvelle protéine formée.

L'ensemble de cette information génétique constitue le patrimoine héréditaire de chaque organisme vivant. Si la capacité de synthèse, qui correspond à cette information, peut être considérée comme une constante, son expression dépend essentiellement de la composition du milieu de culture ainsi que de l'état physiologique de la cellule.

Aussi faut-il admettre l'existence d'un mécanisme régulateur qui permet d'établir un équilibre fonctionnel entre

les besoins de la cellule et ses possibilités de synthèse.

Nous limiterons cette discussion à quelques aspects de la régulation des enzymes intervenant dans la dégradation anaérobie des sucres du moût; ces mécanismes de contrôle étant en rapport direct avec l'objet du présent travail.

Nous avons vu qu'un moût industriel contient des monosaccharides (glucose et fructose), des disaccharides (saccharose et maltose) et des trisaccharides. (maltotrioses) Au cours de la fermentation les sucres sont utilisés dans l'ordre indiqué ci-dessus. (59, 123)

L'utilisation préférentielle par les microorganismes de certains substrats notamment du glucose est connu depuis longtemps. L'effet glucose se traduit par l'inhibition de la synthèse d'un certain nombre d'enzymes par le glucose.

Quoique le phénomène ait été mis en évidence dans le cas de plusieurs enzymes adaptatifs, l'inductibilité n'est pas une condition nécessaire ni suffisante à la sensibilité d'un enzyme au glucose.

Aussi plusieurs enzymes inductibles comme la penicillinase, la nitrate et la tetrathionate réductase sont formées en présence de glucose alors que des enzymes constitutifs (invertase et β -glucosidase) sont sensibles au glucose. (Magasanik 1957) (96) L'effet n'est pas spécifique du glucose. Des substrats comme l'acide gluconique, le mannitol et le galactose peuvent produire le même effet. (80,97)

En règle générale tous les enzymes, dont la formation est inhibée par le glucose, sont susceptibles de transformer leur substrat en métabolites qui peuvent être obtenus indépendamment et avec une vitesse plus grande à partir du glucose. (NEIDHARDT et MAGASANIK 1956) (115)

Notons encore que les deux voies cataboliques différentes du glucose, la voie glycolytique (EMP) et le chemin des hexoses monophosphates (WD) sont largement suffisantes pour

saturer les cellules en précurseurs immédiats de la synthèse des acides nucléiques et des protéines.

En conclusion le métabolisme très rapide du glucose permet une accumulation de catabolites (pyruvate, α céto-glutarate, ribose phosphate, ATP etc...) et réprime de ce fait la biosynthèse des enzymes qui augmenteraient le pool intracellulaire de ces composés.

L'ensemble de ces considérations ont amené MAGASANIK à émettre l'hypothèse de répression catabolique. (98)

LEVIN et MAGASANIK (80) montrent en effet que des substrats carbonés comme le glycérol et l'inositol qui n'exercent pas de répression catabolique peuvent inhiber la synthèse d'enzymes sensibles au glucose à condition d'augmenter la teneur intracellulaire en catabolites en diminuant la vitesse des processus biosynthétiques.

Partant de ce même principe MANDELSTAM (99) constate que des cellules dont la synthèse protéique résulte d'un turnover intracellulaire ne produisent de la β galactosidase qu'en absence d'une source d'énergie.

Jusqu'à présent nous avons considéré la répression catabolique comme le résultat de l'accumulation d'un pool intracellulaire de catabolites non spécifiques. Or suite aux travaux de NEIDHARDT et MAGASANIK (116) et de McFALL et MANDELSTAM (90) plusieurs catabolites répresseurs ont été mis en évidence.

Quoique l'inducteur et le répresseur catabolique agissent au même niveau dans la synthèse protéique (114) les deux mécanismes semblent néanmoins indépendants. En effet, la synthèse de la β galactosidase chez des mutants dérégulés reste sensible au glucose. (84, 112, 100)

Des observations de McQUILLAN, WINDERMAN et HALVORSON (92) sont également en faveur d'un second site de contrôle du glucose, ou d'un catabolite répresseur dérivé du glucose qui serait distinct du site d'induction. Ces auteurs constatent en

effet que le glucose exerce un double effet. Une concentration $10^{-3}M$ inhibe la synthèse de la β -glucosidase dans le cas d'une levure diploïde. (*Saccharomyces Fragilis* x *Saccharomyces dobzhanskii*) Par contre, une concentration de $10^{-4}M$ induit la synthèse de cet enzyme, la stimulation étant parallèle à celle observée en présence de l'inducteur. (β methyl-d-glucoside ou β thio - éthyl -d- glucoside) Le mannose et le galactose s'avèrent sans effet. Se basant sur ces faits expérimentaux HAUGE, McQUILLAN, CLINE et HALVORSON (61) envisagent un double mécanisme de contrôle. Le premier (induction) serait stéréospécifique et agirait au niveau du produit primaire du gène, le second mécanisme au contraire serait non spécifique et inhiberait la libération de l'enzyme de son site de formation: les ribosomes.

Le rôle physiologique et l'intérêt technologique de la répression catabolique nécessitent une connaissance approfondie de ce mécanisme régulateur. Ces raisons nous ont amené à consacrer la première partie du présent travail à l'étude de la répression et de l'induction de l' α glucosidase chez *Saccharomyces Cerevisiae*.

Un autre mécanisme de régulation qui mérite notre attention implique le contrôle de l'activité des enzymes de la voie glycolytique (EMP) en absence de multiplication cellulaire. Cette partie du travail a fait l'objet d'une publication.(108)

Plusieurs auteurs ont signalé des variations importantes de la constitution chimique et enzymatique des cellules de levure après séparation de leur milieu nutritif.

PETT (122) montre une perte graduelle de la teneur en riboflavine après aération de la levure dans un tampon phosphate. La cinétique du phénomène a été étudié par STIER et MAC INTYRE. (143) Après dix heures d'agitation à 25°C. ils observent une diminution de 30% de la teneur en riboflavine. Malheureusement ces auteurs n'ont pu tirer de conclusions au point de vue des activités enzymatiques de la levure.

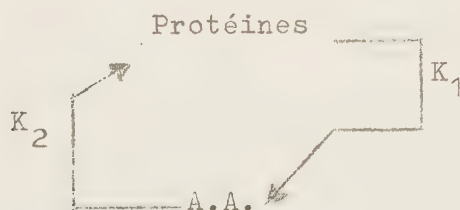
Plus tard STIER et SPRINCE (144) étudient l'inanition par aération prolongée. Celle-ci provoque une diminution considérable du métabolisme aérobie, par contre peu de changements du métabolisme anaérobie. Ces variations sont également attribuées à une diminution de la teneur en riboflavine.

SLOMINSKI (34) fût le premier à faire une étude systématique des conditions physiologiques qui déterminent la capacité fermentaire de la levure de boulangerie. Il ressort des résultats de ce travail qu'une levure anaérobie agitée dans un tampon phosphate perd la majeure partie de sa capacité fermentaire.

Par contre l'incubation dans le tampon ne semble pas influencer les caractéristiques métaboliques des cultures aérobies, même dans le cas de mutants à déficience respiratoire. SLOMINSKI montre également que la cinétique de la perte du pouvoir fermentaire dépend essentiellement des conditions physiologiques de la cellule.

En général les méthodes d'inanition soit par l'épuisement du milieu de culture en certains éléments nutritifs, soit par incubation dans des milieux incomplets favorisent la dégradation intracellulaire de l'ARN et des protéines. (51,103)

Dès lors un système simple constitué d'une population homogène de molécules protéiques (P) peut être considéré en équilibre lorsque la vitesse de dégradation K_1 en acides aminés (A.A.) est égale à la vitesse de resynthèse. (K_2)



Par conséquent le turnover peut être mesuré soit par l'incorporation d'un acide aminé marqué soit par la perte en radioactivité des protéines préalablement marquées.

En fait HALVORSON (52) observe chez la levure une recharge linéaire du pool en acides aminés (TCA solubles à froid) en incubant les cellules en absence d'une source de carbone et d'azote. Ces résultats s'expliquent par une rupture d'équilibre du système entraînant une dégradation des protéines de la cellule.

Un certain nombre d'observations semblent indiquer que les molécules protéiques ne forment pas une population homogène. En effet, certains enzymes comme la *β* galactosidase (161) la nitrataase, la tetrathionase (158) et la lysine apocarboxylase (102) s'avèrent stables dans des conditions favorables à la dégradation intracellulaire d'autres protéines.

La régulation métabolique de la dégradation des protéines et des acides nucléiques en absence de croissance implique soit la synthèse "de novo" d'enzymes hydrolytiques, soit l'activation d'enzymes préexistants.

Remarquons toutefois que l'arrêt de la synthèse protéique, en utilisant le chloramphénicol (101) ou des analogues d'acides aminés (18) ou encore en irradiant les cellules dans l'ultraviolet (53) n'influence pas la vitesse de dégradation des protéines. Par contre les agents de découplément comme le 2-4 dinitrophénol, l'azide et l'arseniate inhibent considérablement la dégradation des protéines et acides nucléiques. (52, 101, 153, 14)

Ces résultats suggèrent que l'activation de systèmes hydrolytiques (peptidases) (6) (et ribonucléases) (137, 142 150) associés aux ribosomes, serait liée à la teneur intracellulaire en certains métabolites phosphorylés et à l'intégrité des particules ribosomiales.

En conclusion la stabilité des protéines et RNA chez les microorganismes (bactéries et levures) est liée à l'état physiologique des cellules.

La dégradation rapide de ces constituants cellulaires, dès l'arrêt de la croissance, pourrait être mise en relation avec la diminution de la vitesse de fermentation en absence de multiplication cellulaire.

Ces raisons nous ont amenés à comparer l'activité de plusieurs enzymes de la fermentation alcoolique (α glucosidase, hexokinase et aldolase) pour des cellules récoltées au cours de la phase exponentielle de croissance et au cours de la phase stationnaire.

L'intérêt de cette étude résulte du fait que le mécanisme de régulation envisagé porte sur un ensemble d'enzymes affectant la vitesse globale de toute la chaîne métabolique.

Le rôle central joué par le phosphate inorganique et par les accepteurs de phosphate (ATP) dans la régulation de la glycolyse a été mis en évidence grâce à l'étude de l'effet Pasteur.

LYNEN (87) émet l'hypothèse qu'au cours de la respiration l'ATP s'accumulerait dans les mitochondries et serait ainsi peu ou pas accessible aux phosphorylations extra mitochondriales du glucose.

En anaérobiose la situation serait assez différente.

En effet, si nous considérons l'ATP comme un produit final du chemin glycolytique nous pouvons admettre que sa teneur intracellulaire dépendra de sa vitesse d'utilisation.

Par conséquent toute condition qui entraîne un ralentissement des réactions biosynthétiques (déphosphorylation) sans ralentissement de la vitesse de dégradation du glucose (phosphorylation) conduirait inévitablement à une accumulation d'ATP et à une rupture de l'équilibre ATP-ADP.

On devrait normalement s'attendre à une régulation des enzymes glycolytiques par l'ATP. Ceci semble être le cas

puisque la vitesse de fermentation diminue en absence de multiplication cellulaire.

Il convient de signaler ici les travaux de VINUELA, SALAS et SOLS(156) qui montrent une inhibition de la phosphohexokinase par l'ATP qui agirait par rétroinhibition au niveau d'un second site, le site inhibiteur.

Il est intéressant de noter qu'il y a compétition entre le fructose phosphate et l'ATP pour le site inhibiteur.

L'activité de l'enzyme diminue avec la concentration en ATP mais augmente proportionnellement au carré de la concentration en fructose-6-phosphate.

Cette inhibition par feedback ou rétroinhibition est analogue à celle observée dans le cas de nombreuses séquences biosynthétiques (7, 113, 147, 148) avec la particularité toutefois que le produit final est également substrat de l'enzyme inhibé.

Le fait que les essais ont été effectués pour un certain nombre de concentrations physiologiques permet d'envisager l'inhibition allostérique (110, 111) de la phosphofructokinase par l'ATP comme un second mécanisme de contrôle possible de la fermentation alcoolique.

+ . + . + . + . + . +

O B J E T D U T R A V A I L

Le rôle important qu'a joué la levure sur l'évolution de la biochimie et de la génétique s'explique par le fait qu'il s'agit là d'un matériel unique aussi bien par ses modes de vie (aérobie et anaérobie) que par ses modes de reproduction. (sexuée et asexuée).

Il serait dès lors logique de s'attendre à une évolution parallèle de nos connaissances biochimiques et génétiques des souches utilisées en brasserie. Or, il s'avère que la recherche en brasserie s'est plutôt orientée vers des problèmes apparemment plus pratiques négligeant en quelque sorte certains aspects fondamentaux du métabolisme de *Saccharomyces Cerevisiae* et *Saccharomyces Carlsbergensis*.

Bien souvent la caractérisation des levures hautes et basses se limite encore aujourd'hui à leur comportement physique dans le milieu de culture.

Pourtant des travaux récents ont montré que ces deux races de levures constituent deux entités biochimiques distinctes. (44, 45)

Ces raisons nous ont amené à développer d'autres critères de caractérisation permettant non seulement de différencier les souches entre elles mais également de contrôler leurs activités métaboliques au cours du temps.

Les enzymes intervenant dans le transport actif et l'hydrolyse du maltose et du maltotriose sont inductibles et de ce fait répressibles.

En fait HARRIS et MILLIN (58) ont montré que l'utilisation préférentielle des sucres du mout s'explique par une séquence d'inductions suite à des changements de la composition hydrocarbonée du milieu de culture. Par ailleurs ces mêmes auteurs observent un fléchissement de la capacité fermentaire de

la levure à la fin de chaque cycle de fermentation.

Ces différents aspects de la régulation du métabolisme fermentaire chez *Saccharomyces Cerevisiae* et *Saccharomyces Carlebergensis* feront l'objet du présent travail.

+ . + . + . + . + . +

M A T E R I E L E T T E C H N I Q U E

A. - CULTURES

1. Souches de levure:

Nous avons utilisé différentes souches de notre collection se caractérisant soit comme des levures hautes soit, comme des levures basses.

2. Milieu de culture:

a) composition du milieu complet:

extrait de levures (Difco)	5	g/L
KH_2PO_4	2,16	g/L
Na_2HPO_4	0,7	g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,6	g/L
MgSO_4	0,5	g/L
CaCl_2	0,5	g/L
glucose ou maltose	20	g/L
	ou 100	g/L

La solution est amenée à un pH final de 6,1 avant stérilisation.

b) composition du milieu minéral:

KH_2PO_4	1	g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,2	g/L
MgSO_4	0,7	g/L
CaCl_2	0,4	g/L
NaCl	0,5	g/L
acide citrique	10,5	g/L
glucose ou maltose à déterminer		
traces minérales	1	cc/L
vitamines	10	cc/L

La solution est amenée à un pH final de 6,1 avant stérilisation.

Solution de traces minérales :

Acide borique	500	mg/L
sulfate de Cu	40	mg/L
KI	100	mg/L
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5	g/L
MnSO_4	400	mg/L
Molybdate de Na	200	mg/L
sulfate de Zn $7\text{H}_2\text{O}$	720	mg/L
acide citrique	10	gr/L

Solution de vitamines

a) panthotenate Ca	200	mg/L
biotine	250	$\mu\text{g/L}$
acide nicotinique	100	mg/L
thiamine	100	mg/L
inositol	500	mg/L
riboflavine	100	mg/L
P.A.B.	50	mg/L
pyrodoxine	100	mg/L

Chauffer légèrement pour dissoudre et stériliser à 1/2 kg. pendant 20'.

b) acide folique: 500 μ gr/12,5 mg H_2C + 1 goutte NaOH N, stériliser par filtration.

Ajouter 1 cc de solution b par 100 cc de solution a.
(après stérilisation)

3. Techniques de culture:

a) croissance anaérobie:

Les croissances se font à 30° C en culture non agitée dans des fioles cylindro coniques

b) croissance aérobie:

Les croissances se font à 30°C. L'aération se fait par agitation des fioles sur un plateau animé d'un

mouvement de translation circulaire

c) mesure de croissance:

La croissance est suivie par la détermination régulière de l'opacité de la culture. Les opacités sont exprimées en densité optique ($d.o. = \log. I_0/I$) pour une épaisseur de 1 cm.

Un rapport a été établi au préalable entre d.o. et poids sec.

B. - DETERMINATION DE L'ACTIVITE DE LA MALTOZYMASE PAR MESURE DE LA FERMENTATION DU MALTOSE

Les cellules sont récoltées par centrifugation, lavées trois fois à l'eau physiologique à 0°C. et finalement mises en suspension dans un tampon phosphate M/15 à pH 4,5 (2 mg poids sec/CC)

La cupule latérale contient 0,3 cc d'une solution de maltose à 4%. Les dosages sont effectués en anaérobiose à 30°C suivant la technique manométrique de Warburg. (v. Umbreit et Coll.) (155)

Le $Q^{N_2}_{CO_2}$ correspondant à la fermentation du maltose est une mesure linéaire de l'activité de l'enzyme. (23,139)

Le volume total du liquide dans les fioles est de 2 cc.

L'anaérobiose est réalisée en faisant passer dans les fioles pendant 20 minutes un courant d'azote.

C. - DOSAGE DES PROTEINES

Toutes les déterminations d'activité enzymatique en extrait sont exprimées en la rapportant au mg de protéine. Les dosages de protéines sont effectués selon la méthode du biuret. La courbe étalon est établie avec la sérum albumine. La densité optique du complexe coloré protéine-Cuivre est mesurée au spectrophotomètre Unicam à 545 mμ.

D. - PREPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DU MALTOTRIOSE

Le maltotriose est obtenu par fermentation avec *Saccharomyces uvarum* d'une solution contenant 15% en poids d'un hydrolsat d'amidon.

Les fermentations sont effectuées en culture agitée et à 30°C pendant 72 heures.

Après filtration sur kieselguhr, la solution subit une nouvelle fermentation de 48 heures dans les mêmes conditions. Après filtration, les polysaccharides sont précipités par l'acétone à 50%. L'acétone est ensuite éliminé par évaporation sous vide.

Le maltotriose est finalement purifié par élution sur charbon de bois célité à l'aide d'un mélange eau-éthanol acidifié à pH 3 par l'acide formique. (méthode de GJERTSEN (38) modifié par TAYLOR et WHELAN) (151)

Les hexoses libres et polysaccharidiques des fractions après élution sont dosées par la méthode de DUBOIS. (27)

E. - SEPARATION ET ISOLEMENT D'ASCOSPORES

Milieu de présporulation: (89)

Extrait de levures 0,5%; glucose 2%; $(\text{MH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2%; $\text{K H}_2\text{PO}_4$ 0,2%.

Milieu de sporulation: (32)

Acétate de Sodium anhydre 0,5%; agar 1,5%; pH 6,8

Sporulation :

Après 48 heures d'incubation sur le milieu de présporulation, les cellules sont centrifugées et lavées 2 fois à l'eau distillée puisensemencées sur le milieu de sporulation à raison de 10^6 cellules par cc. L'isolement des ascospores se fait après 6 jours d'incubation à 25°C.

Isolement des ascospores:

La microdissection est effectuée après digestion de

la membrane de l'asque par le suc digestif d'*Helix Pomatia*. (L'industrie biologique française, 35-49, quai du Moulin de Cage - Gennevilliers, Seine) (73)

La préparation est additionnée de 15 mg de chlorhydrate de cystéine par cc immédiatement avant l'emploi . On prépare le mélange suivant: 4 gouttes d'eau distillée stérile, 2 gouttes de la population d'asques et 2 gouttes d'enzyme. Le temps nécessaire pour obtenir une séparation aisée des spores est généralement de 10 à 20 minutes mais dépend essentiellement de la souche utilisée.

Sur une lamelle couvre-objet de la dimension de la chambre à dissection, on a placé une plaque d'agar à 2% de dimensions légèrement inférieures à celle de la lamelle de verre et d'environ 2 mm. d'épaisseur. Sur un bord de cette plaque on étale une anse du mélange d'asques traité par l'enzyme. L'ensemble est posé sur la chambre à dissection fermée par une seconde lamelle. A l'aide d'une pointe en verre étirée à la microforge et placée sur le micromanipulateur de Fonbrune on isole des asques dont on dépose les 4 spores à 3 mm/ l'une de l'autre à partir du bord de la plaque d'agar opposé à celui sur lequel l'étalement a été fait. On dépose ensuite la plaque d'agar sur la surface d'une boîte de Pétri contenant un milieu complet, gelosé enrichi en jus de tomate (Difco) à raison de 0,5%.

+ . + . + . + . + . +

C H A P I T R E I

ETUDE DE LA REGULATION DE LA FERMENTATION DU

MALTOSE ET DU MALTOTRIOSE CHEZ

SACCHAROMYCES CEREVISIAE ET SACCHAROMYCES

CARLSBERGENSIS

P L A N D E T A I L L E

	<u>Page</u>
I. <u>ETUDE DE LA FERMENTATION DU MALTOSE</u>	30
A. Répression:	30
a) levures hautes	31
b) levures basses	31
B. Induction:	34
II. <u>ETUDE DE LA FERMENTATION DU MALTCTRIOSE</u>	36
III. <u>CARACTERISATION BICCHIMIQUE DE DEUX CULTU-</u> <u>RES MONOSPORES ISSUES DES SOUCHES 106 et</u> <u>173</u>	38
1) essais de sporulation	38
2) caractérisation biochimique des souches 106/6/2 et 173/2/3	40
IV. <u>ETUDE DE LA REGULATION DE LA FERMENTATION</u> <u>DU MALTOSE PAR LE GLUCOSE</u>	41
1) évolution de la vitesse de fermentation sur maltose au cours de la croissance et en fonction de la concentration en gluco- se du milieu	41
2) influence de la concentration en glucose sur l'activité de la maltozymase	44
3) évolution du pouvoir fermentaire sur mal- tose au cours de la croissance sur gluco- se et sur maltose après répression par le glucose 10%	48
4) influence de l'actidione et de la p. fluo- ro-phenylalanine sur l'évolution du pouvoir fermentaire sur maltose au cours de la crois- sance sur 0,15% de glucose après répression par le glucose 10%	50
5) évolution du pouvoir fermentaire sur mal- tose en absence de multipl.cellulaire a-	

ETUDE DE LA REGULATION DE LA FERMENTATION DU MALTOSE ET
DU MALTOTRIOSE CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE ET SACCHARO-
MYCES CARLSBERGENSIS

Peu de travaux ont été consacrés jusqu'à présent à l'étude de la stabilité des propriétés physiques, physiologiques, et biochimiques des levures de brasserie.

Rappelons toutefois l'excellent travail de THORNE, sur la stabilité d'une souche de levure de brasserie, qui a été publié récemment dans les proceedings du colloque sur les levures qui s'est tenu à Paris. (154)

MILLIN (109) montre d'autre part que l'inductibilité des enzymes intervenant dans le transport et l'hydrolyse du maltose et du maltotriose dépend non seulement de la composition du milieu mais également de la souche de levures utilisée.

Ceci nous a amené à faire une analyse systématique de la répression et de l'induction de la maltozymase pour un certain nombre de souches de levures hautes et basses de notre collection.

Cette étude s'est limitée à des mesures de vitesse de fermentation sur maltose et maltotriose au cours des transferts successifs sur milieu glucosé soit au cours de l'incubation en présence de l'inducteur et en absence d'azote. Ces conditions permettent en effet de considérer toute variation de la vitesse de fermentation comme une expression quantitative du taux d'enzymes inductibles.

I. - ETUDE DE LA FERMENTATION DU MALTOSE

A. REPRESSION :

a) levures hautes

cultures: les croissances sont effectuées en aérobiose avec agitation à 30°C. Les milieux utilisés contiennent soit 2% de glucose, soit 2% de maltose et 0,5% d'extrait de levures. (Difco)

Les mesures manométriques (fermentation $Q^{N_2}_{CO_2}$) sont effectuées sur cellules récoltées en phase exponentielle de croissance en présence de glucose ou de maltose à 4%, pH 4,5 et à 30°C.

On détermine simultanément le pouvoir fermentaire sur glucose et sur maltose après un transfert sur milieu glucosé avec doublement de la population ensuite après une deuxième croissance sur glucose et finalement après une troisième croissance sur le même substrat.

Le tableau 1 donne les pouvoirs fermentaires après 60 minutes d'incubation dans le tampon phosphate à pH 4,5. Les valeurs sont exprimées respectivement sur glucose et sur maltose après croissance aérobie sur maltose (1M) et après croissance successive sur glucose. (1G; IIG; IIIG)

Tableau 1.

Pouvoirs fermentaires sur glucose et maltose de quelques souches de levures hautes après croissance sur maltose (1M) et après croissance successive sur glucose. (1G; IIG; IIIG)

Levure n°	Pouvoir fermentaire après croissance ($Q_{CO_2}^{N_2}$)							
	I M		I G		II G		III G	
	G	M	G	M	G	M	G	M
173	241	303	224	239	221	217	230	235
109	281	404	500	426	450	420	434	390
123	269	246	392	87	356	89	300	57
101	269	279	315	121	391	160	334	197
106	304	409	307	175	316	160	324	87
105	310	324	317	186	350	205	405	251

Il ressort des résultats exprimés dans le tableau 1 que la vitesse d'utilisation du maltose varie sensiblement d'une souche à une autre après un ou plusieurs transferts sur glucose. Certaines souches (n° 173 et 109) fermentent le maltose pratiquement à la même vitesse que le glucose en absence de l'inducteur.

D'autres souches voient leur capacité fermentaire diminuer de 50% après un doublement de la population sur glucose. (n° 101 et 106)

Un troisième groupe se caractérise par une désadaptation très rapide (n° 123), la vitesse de fermentation se stabilisant à 25% de la valeur initiale après le deuxième transfert sur glucose.

b) levures basses :

cultures: les conditions expérimentales sont celles utilisées précédemment. (voir levures hautes)

Le tableau 2 donne les pouvoirs fermentaires après 60 minutes d'incubation dans le tampon phosphate pH 4,5.

Tableau 2.

Pouvoirs fermentaires sur glucose et maltose de quel-

ques souches de levures basses après croissance sur maltose (1 M) et après croissance successive sur glucose. (1G; IIG; IIIG)

Levure n°	Pouvoir fermentaire après croissance ($q_{CO_2}^{N_2}$)							
	1 M		I G		II G		III G	
	G	M	G	M	G	M	G	M
112	288	319	332	35	342	33	350	36
124	356	409	389	37	389	39	406	31
301	342	375	334	80	330	32	320	30
303	404	451	300	63	285	46	305	35
304	378	436	340	94	325	25	340	32
216	313	320	308	151	380	129	364	42
309	331	436	340	91	330	58	360	45

Il ressort de l'ensemble de ces résultats que le phénomène de désadaptation à la fermentation du maltose est général. En effet, à une exception près (souche n° 216) toutes les souches analysées se désadaptent complètement après un seul transfert sur glucose et les pouvoirs fermentaires sur maltose et sur glucose se stabilisent dans un rapport d'environ 1 à 10.

Revenons maintenant au cas de la souche 216 qui a un pouvoir fermentaire de 151 sur maltose après doublement sur milieu glucosé contre 320 après croissance sur maltose. Dans ce cas, la diminution de la vitesse d'utilisation du maltose pourrait s'expliquer par un phénomène de répression impliquant un arrêt du taux différentiel de synthèse de la maltozymase.

En d'autres mots, la diminution de la vitesse de fermentation sur maltose est proportionnelle à l'augmentation de la masse cellulaire. Cette souche serait donc à classer au point de vue régulation parmi les levures hautes. Notons également que cette levure a une tendance à monter en surface en fin de fermentation et que d'autre part, elle se caractérise par un taux de sporulation élevé sur Fowell-Agar, ce qui est exceptionnel

pour une levure basse.

Ces résultats nous ont amené à préciser le phénomène en étudiant la cinétique de la perte de la maltozymase en fonction de l'augmentation de la masse cellulaire après croissance sur milieu glucosé.

On procède comme suit: les cellules sont récoltées en phase exponentielle de croissance après croissance sur maltose, centrifugées et lavées stérilement dans un tampon phosphate à pH 4,5 et ensuite ensemencées sur milieu glucosé à une densité optique de 0,200.

Les déterminations manométriques ($Q_{CO_2}^{N_2}$) sur maltose sont alors effectuées après 1, 2, 3 et 4 heures d'incubation correspondant respectivement à des densités optiques de 0,250; 0,300; 0,350 et 0,400.

Suivant ci-après les pouvoirs fermentaires calculés après 60 minutes d'incubation à 30°C.

Tableau 3.

Levure	densité optique de la récolte				
n°	0,200	0,250	0,300	0,350	0,400
167	380	55	30	28	23
131	320	49	52	44	55
112	335	35	38	32	36

Il ressort de ces résultats que le phénomène est extrêmement rapide et que le glucose provoque non seulement un arrêt de la synthèse de la perméase ou de l' α glucosidase mais également soit une inactivation soit une dégradation du potentiel enzymatique existant.

En effet, en admettant qu'il existe une proportionnalité entre densité optique et masse cellulaire nous pourrions prévoir une perte d'activité fermentaire de 20% en amenant la densité optique de 0,200 à 0,250. Or, dans ces condi-

tions le pouvoir fermentaire représenterait encore 80% de la valeur initiale. Puisque celui-ci ne s'élève plus qu'à 10% de la valeur maximum nous devons admettre un système de régulation de l'utilisation du maltose par le glucose autre que celui basé sur la répression.

B. INDUCTION

L'étude de la cinétique d'induction de la maltozymase chez la levure est considérablement facilitée par le fait que celle-ci peut avoir lieu en absence d'une source d'azote. La vitesse de fermentation augmente dans le temps pour une levure cultivée au préalable sur glucose et mise en suspension dans un tampon contenant du maltose alors que celle-ci reste pratiquement constante après croissance sur maltose.

Nous avons suivi l'évolution de la vitesse de fermentation du maltose pour un certain nombre de souches de levures hautes et basses après incubation anaérobie en présence de 4% de maltose dans un tampon phosphate à pH 4,5. Les résultats sont exprimés dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4.

Evolution de la vitesse d'utilisation du maltose de quelques souches de levures basses après croissance successive sur glucose : un premier transfert avec doublement; une deuxième (2) et une troisième croissance. (3)

Souche	Nombre de transferts	Temps d'incubation en heures						
		1	2	3	4	5	6	7
167	1	23	25	37	76	137	208	214
	2	26	25	28	69	125	198	202
	3	21	28	31	52	109	169	198

112	1	35	32	38	81	151	214	288
	2	33	36	31	75	138	202	269
	3	29	31	38	70	135	197	255
216	1	129	250	392				
	2	42	33	54	133	223	258	
	3	37	38	45	118	198	242	
132	1	49	78	118	179	260	262	
	2	52	73	88	133	200	254	
	3	35	65	78	122	197	244	

Tableau 5.

Evolution de la vitesse d'utilisation du maltose de quelques souches de levures hautes après croissance successive sur glucose: un premier transfert avec doublement (1); une deuxième (2) et une troisième croissance. (3)

Souche	Nombre de transferts	Temps d'incubation en heures			
		1	2	3	4
109	1	426			
	2	420			
	3	390			
173	1	224	310		
	2	217	307		
	3	235	298		
106	1	165	412		
	2	197	395		
	3	188	371		
123	1	87	175	375	410
	2	89	206	378	377
	3	57	67	164	264

Il ressort des résultats des tableaux 4 et 5 que les valeurs obtenues après 60 minutes d'incubation en présence de maltose sont pratiquement les mêmes après une ou plusieurs croissances successives sur glucose sauf dans le cas de la souche 216. Par contre la vitesse maximum et le temps nécessaire pour obtenir un accroissement linéaire est une fonction directe du nombre de transferts. Il est intéressant de noter que les levures basses se comportent d'une façon très différente par rapport aux levures hautes. En effet, il faut environ 7 heures pour obtenir la vitesse d'utilisation maximum dans le cas des levures basses, alors que celle-ci est atteinte après 3 heures dans le cas des levures hautes.

Nous remarquons également que la cinétique d'induction de la maltozymase est très différente d'une souche à une autre et constitue donc un critère utile pour caractériser les levures de brasserie.

La figure 1 montre l'évolution de la vitesse de l'adaptation pour quelques souches de levures. La pente de la partie linéaire de ces courbes est caractéristique pour les levures hautes et basses et même pour chacune de ces souches.

La figure 2 montre que la souche n° 216 se comporte une fois de plus après le premier transfert sur glucose comme une levure haute aussi bien au point de vue phase de latence qu'au point de vue vitesse d'induction. Il n'en est plus de même après un deuxième transfert sur glucose, dans ces conditions la latence passe de 60 minutes à 140 minutes.

II. - ETUDE DE LA FERMENTATION DU MALTOTRIOSE

Cultures: Les conditions de croissance et les milieux de culture sont ceux utilisés dans le cas du maltose.

Les mesures manométriques ($Q_{CO_2}^{N_2}$) sont effectuées sur

$\mu\text{l CO}_2/\text{mg levure sèche}/10 \text{ min.}$

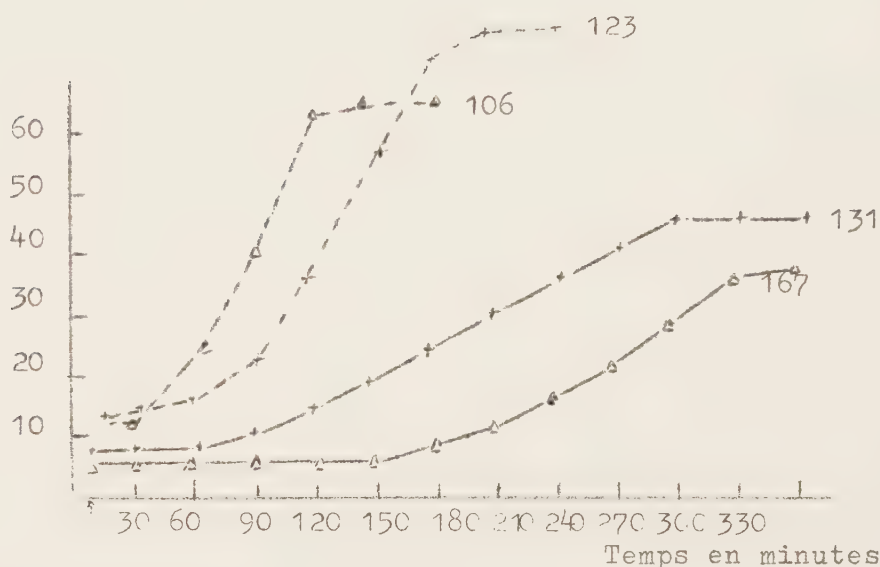


Figure 1.: Cinétique d'induction de la maltozýmase de deux levures hautes (N° 123 et 106) et de deux levures basses (N° 131 et 167) après croissance aérobique sur maltose suivie d'un transfert sur glucose avec doublement.

$\mu\text{l CO}_2/10 \text{ min.}/\text{mg levure sèche}$

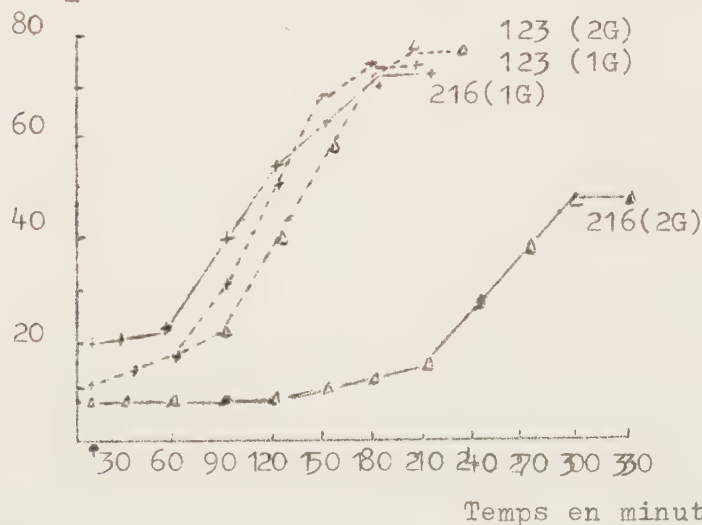


Figure 2.: Cinétique d'induction de la maltozýmase d'une levure haute (n° 216) après croissance aérobique sur maltose suivie d'un premier transfert sur glucose (1g) et d'une deuxième croissance sur le même substrat.(29)

des cellules récoltées en phase exponentielle de croissance en présence de glucose (G) de maltose (M) et de maltotriose (MT) à 4%, à pH 4,5 et à 30°C.

Suivent ci-après les pouvoirs fermentaires après croissance sur glucose, maltose, et maltotriose pour trois souches de levures basses.

a) croissance sur glucose:

souche n° 112: (G): 306; (M): 50; (MT): 6

souche n° 167: (G): 313; (M): 45; (MT): 3

souche n° 310: (G): 310; (M): 76; (MT): 0

b) croissance sur maltose:

souche n° 112: (G): 295; (M): 335; (MT): 242

souche n° 167: (G): 322; (M): 387; (MT): 370

souche n° 310: (G): 315; (M): 360; (MT): 340

c) croissance sur maltotriose:

souche n° 112: (G): 280; (M): 330; (MT): 228

souche n° 167: (G): 270; (M): 332; (MT): 312

souche n° 310: (G): 305; (M): 345; (MT): 345

Il ressort de ces résultats que le maltose induit simultanément les enzymes intervenant dans l'utilisation du maltose et du maltotriose.

Si l' α glucosidase permet l'hydrolyse de ces deux sucres (20) il n'en est pas de même pour la perméase qui semble spécifique pour chacun de ces substrats carbonés. (56) Il faudrait dans ces conditions admettre deux systèmes de transport actif sous contrôle d'un même inducteur, ce qui impliquerait l'existence d'un mécanisme régulateur commun à ces deux systèmes de perméation.

Des essais ont ensuite été effectués dans le but de déterminer l'évolution du pouvoir fermentaire sur maltotriose en fonction de l'accroissement de la masse cellulaire sur glucose.

A cet effet les cellules sont récoltées en phase exponentielle après croissance sur maltotriose, ensuite lavées et ensemencées sur milieu glucosé à 2% à une densité optique de 0,200. Les déterminations manométriques ($Q_{CO_2}^{N_2}$ maltotriose) sont alors effectuées après 1 et 2 heures d'incubation correspondant à des densités optiques de 0,250 et 0,300.

Suivent ci-après les résultats pour la souche 112/ d.o . 0,200: 312; d.o. 0,250; 6; d.o. 0,300: 6.

Nous remarquons non seulement un arrêt du taux différentiel de synthèse mais également une inactivation ou une dégradation des enzymes préformés.

En effet, une augmentation de la masse cellulaire de 20% suffit pour réduire l'activité fermentaire à 5% de sa valeur initiale.

III. - CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE DEUX CULTURES MONOSPORES ISSUES DES SOUCHES 106 ET 173.

1) Essais de sporulation:

Les essais ont été effectués avec les souches 173, 109, 101, 106 et 107. La figure 3 représente les taux de sporulation observés ainsi que la répartition des asques au point de vue nombre de spores.

Nous remarquons que pour des taux de sporulation allant de 40 à 60% les asques à 4 spores représentent environ 10 à 40% par rapport au nombre total d'asques. La souche 167 ne sporule pas, il en est de même pour toutes les levures basses testées.

L'isolement d'un grand nombre de spores a montré que le taux de germination ainsi que la viabilité des cellules issues de ces spores est extrêmement faible. Il en résulte qu'aucune analyse de tétrades n'a pu être envisagée.

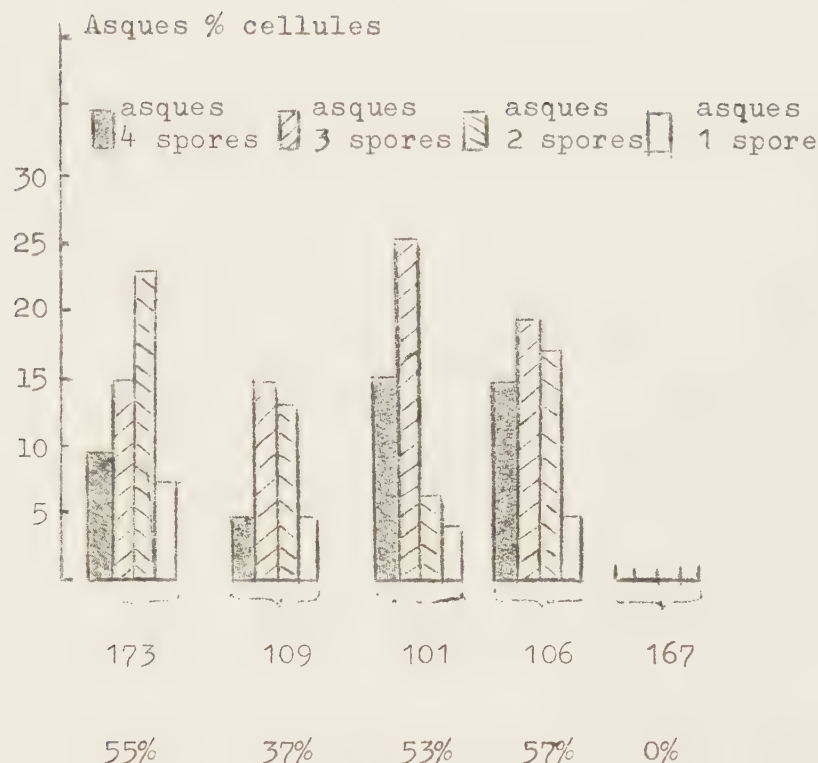


Figure 3: Diagramme de répartition du nombre de spores par asque pour quelques souches de *S. Cerevisiae* et pour une souche de *S. Carlsbergensis*.

Ces résultats confirment ceux obtenus par JOHNSTON (74) et WINDISCH (164) qui attribuent ces anomalies à l'aneuploïdie des spores résultant d'une polyplôidie impaire des levures de brasserie.

Néanmoins un certain nombre de microcolonies ont pu être isolées à partir des souches 173 et 106. Ces microcolonies ont été examinées au point de vue conjugaison avec des souches haploïdes α et a et au

point de vue resporulation sur Fowell Agar.

Environ 50% des cultures monospores examinées resporulent et ne conjugent ni avec le type α ni avec le type α .

Nous avons finalement sélectionné deux souches haploïdes (106/6/2 et 173/2/3) issues d'une première sporulation des souches mère. (106 et 173). Notons toutefois que la détermination du degré de ploïdie des souches sélectionnées se base uniquement sur des essais de sporulation et de croisement avec des souches de signe opposé.

2) Caractérisation biochimique des souches 106/6/2 et 173/2/3:

Cultures: les conditions expérimentales sont celles utilisées précédemment. On détermine simultanément le pouvoir fermentaire sur glucose et sur maltose après transfert sur milieu glucosé avec doublement de la population, ensuite, après une deuxième croissance sur glucose et finalement après une troisième croissance sur le même substrat. Les souches 173 et 106 ont été utilisées comme terme de comparaison.

Tableau 6.

Pouvoirs fermentaires sur glucose et maltose après croissance sur maltose (IM) et après croissance successive sur glucose. (IG; IIG; IIIG)

Levure	$\frac{N_2}{CO_2}$ après croissance							
	I M		I G		II G		III G	
	G	M	G	M	G	M	G	M
173	255	295	245	250	231	235	240	235
173/2/3	262	281	254	276	241	226	245	220
106	330	420	315	192	316	168	306	102
106/6/2	310	392	298	186	302	112	285	85

Nous remarquons que le comportement des cultures monospores est parallèle à celui des souches mère.

La souche 173/2/3 est constitutive et la souche 106/6/2 se caractérise par une dilution de l'activité de la maltozymase qui est proportionnelle à l'accroissement de la masse cellulaire tout au moins pendant la première génération sur milieu glucosé.

IV. - ETUDE DE LA REGULATION DE LA FERMENTATION DU MALTOSE PAR LE GLUCOSE.

- 1) Evolution de la vitesse de fermentation sur maltose au cours de la croissance et en fonction de la concentration en glucose du milieu:

Les résultats précédents ont montrés que certaines souches se caractérisent par une diminution de la vitesse de fermentation du maltose proportionnelle à l'augmentation de la masse cellulaire en utilisant le glucose comme seule source carbonée de culture.

Dans le but de préciser le phénomène dans le cas de la souche n° 106/6/2 nous avons suivi l'évolution de la vitesse de fermentation sur maltose au cours d'une croissance sur un milieu contenant 2% de glucose.

Après 24 heures de croissance à 30°C en culture non agitée, les cellules sont centrifugées et lavées puisensemencées sur le même milieu à une densité optique de 0,100; les croissances se font ensuite en aérobiose et à 30°C. On détermine les pouvoirs fermentaires sur maltose ($Q^{N_2}_{CO_2}$) en effectuant des prélèvements en fonction du temps de croissance et correspondant aux d.o. suivantes: 0,200; 0,400; 0,610; 0,720 et 1,0.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 7.

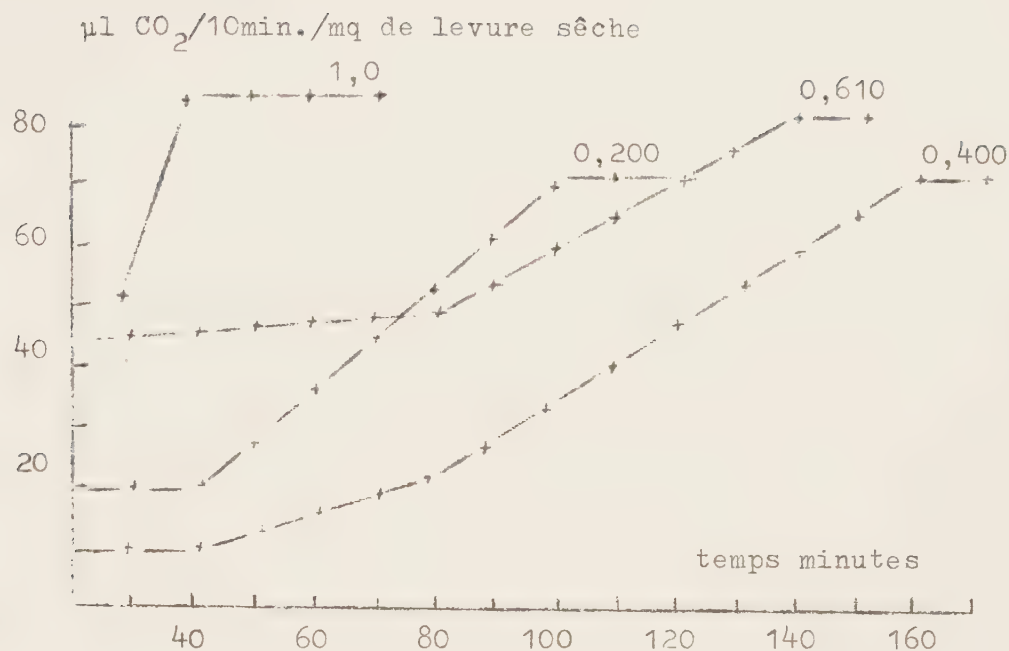


Figure 4.: Evolution de la vitesse de fermentation sur maltose au cours d'une croissance sur un milieu contenant 2% glucose.

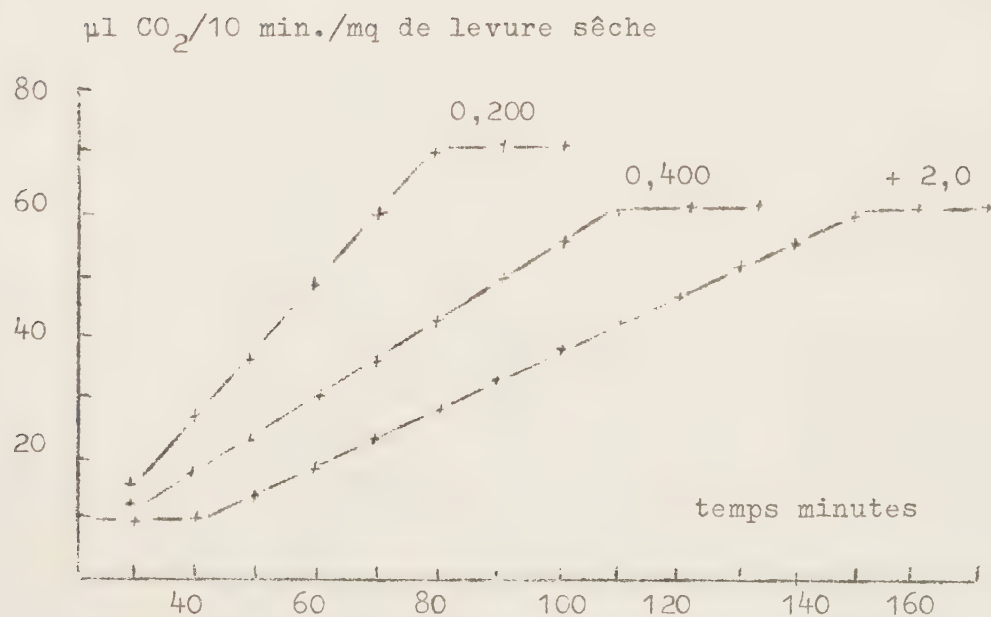


Figure 5.: Evolution de la vitesse de fermentation sur maltose au cours d'une croissance sur un milieu contenant 10% glucose.

Tableau 7.

Evolution du pouvoir fermentaire sur maltose au cours d'une croissance sur un milieu contenant 2% de glucose.

Temps d'incubation en heures sur maltose 4%	densité optique de la récolte				
	0,200	0,400	0,610	0,720	1,0
1	124	67	275	312	400
2	370	227	325	365	432
3		370	420		

Nous remarquons que les vitesses de fermentation, calculées après 60 minutes d'incubation au Warburg présentent des variations considérables au cours de la croissance. Le pouvoir fermentaire sur maltose passe par un minimum après 2 générations sur glucose 2% et augmente ensuite graduellement avec l'accroissement de la masse cellulaire pour atteindre un maximum à une d.o. de 1,0. (voir figure 4)

Notons également qu'il faut un temps d'incubation d'environ 3 heures après 2 générations sur glucose 2%, ce temps étant réduit à 40 minutes en fin de croissance. (voir figure 4)

Ces résultats semblent indiquer que le phénomène d'inhibition dépend considérablement de la concentration en glucose du milieu. De fortes concentrations inhibent en grande partie la synthèse des enzymes intervenant dans la fermentation du maltose, alors que de faibles concentrations stimulent la synthèse de ces mêmes enzymes. Ceci nous a amené à reprendre ces essais utilisant un milieu contenant 10% de glucose. Les conditions expérimentales sont celles utilisées ci-dessus.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 8.

Tableau 8.

Evolution du pouvoir fermentaire sur maltose au cours d'une croissance sur un milieu contenant 10% de glucose.

Temps d'incubation en heures sur maltose 4%	densité optique de la récolte				
	0,200	0,400	0,600	0,800	1,0
1	199	160	150	143	78
2	370	320	350	377	234
3					316
4					339

Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment. En effet, en maintenant une forte concentration en glucose dans le milieu nous obtenons une stabilisation des pouvoirs fermentaires à environ 20% de la valeur obtenue, soit après croissance en présence de l'inducteur soit en fin de croissance en utilisant le glucose à 2% comme seule source carbonée de culture. (voir figure 5 et 6)

2) Influence de la concentration en glucose sur l'activité de la maltozymase:

Jusqu'à présent les essais ont été effectués avec des milieux contenant 0,5% d'extrait de levures. (Difco) Afin de travailler dans des conditions mieux définies et aussi parce que l'extrait de levures contient des traces de maltose, nous utiliserons dans la suite de ce travail, le milieu minéral décrit dans le chapitre consacré aux techniques.

Nous opérons comme suit: les cellules sont récoltées après un doublement de la masse cellulaire sur un milieu glucosé

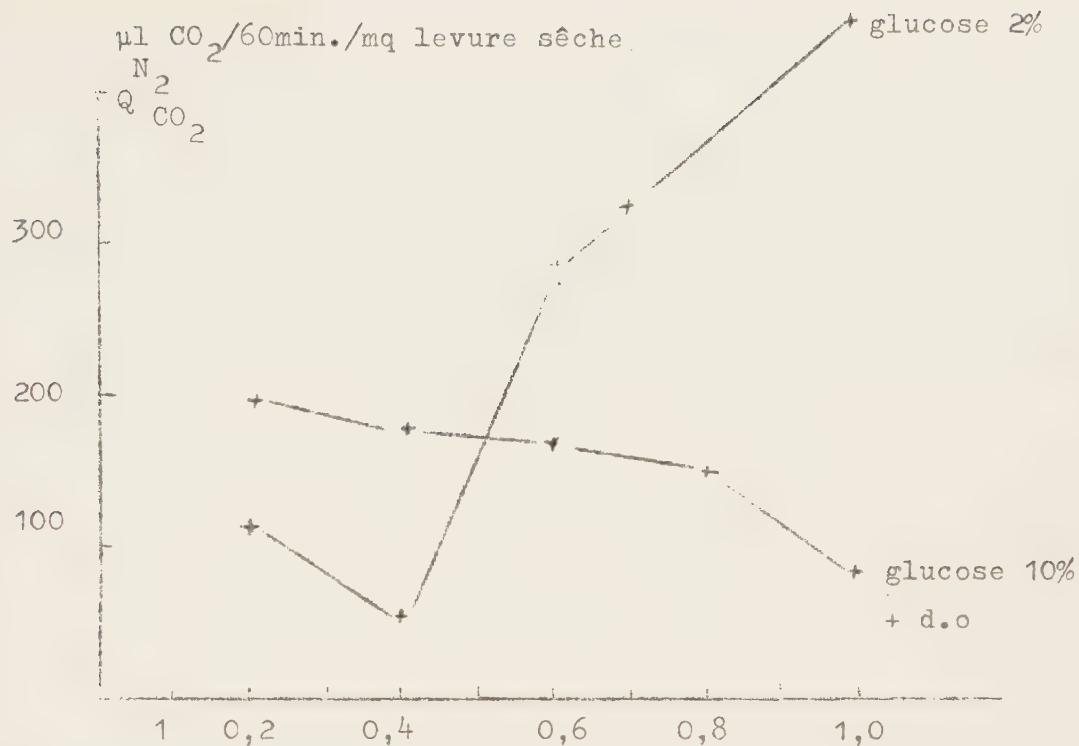


Figure 6.: Evolution du pouvoir fermentaire sur maltose sur un milieu contenant 2% et 10% de glucose.

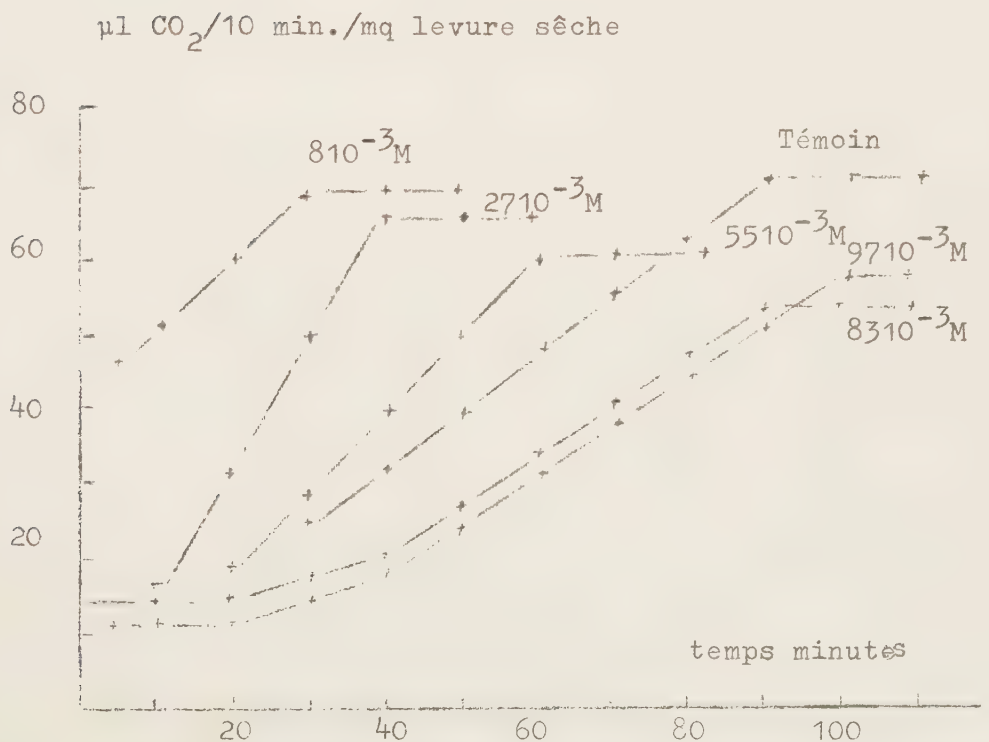


Figure 7.: Influence de la concentration en glucose sur la vitesse de fermentation du maltose.

à 2%, sont ensuite lavées et ensemencées sur le même milieu contenant des concentrations croissantes en glucose. On détermine le pouvoir fermentaire sur maltose ($Q_{CO_2}^{N_2}$) après 2 générations en culture agitée et à 30°C. Les résultats sont exprimés dans le tableau 9.

Tableau 9.

Influence de la concentration en glucose sur la vitesse de fermentation du maltose.

Temps d'incuba- tion en heures sur mal- tose 4%	Départ Gluc. 2%	0,15% $8 \cdot 10^{-3} M$	0,5% $(27 \cdot 10^{-3} M)$	1% $(55 \cdot 10^{-3} M)$	1,5% $(83 \cdot 10^{-3} M)$	1,75% $(97 \cdot 10^{-3} M)$
1	182	344	260	212	130	124
2	406	332	340	342	286	297

Il ressort de ces résultats que les concentrations en glucose nécessaires pour inhiber la synthèse de la maltozymase sont de l'ordre de $5 \cdot 10^{-2} M$. Par contre si la croissance s'effectue à des plus faibles concentrations $8 \cdot 10^{-3} M$ nous remarquons un accroissement de la vitesse de fermentation. (voir figure 7 et 8)

Cet accroissement devrait correspondre à la synthèse d'un des enzymes (perméase et α glucosidase) intervenant dans la fermentation du maltose.

Dans le but de préciser le phénomène nous avons étudié l'évolution du pouvoir fermentaire sur maltose au cours de la croissance sur glucose 0,15% après répression par le glucose à 10%.

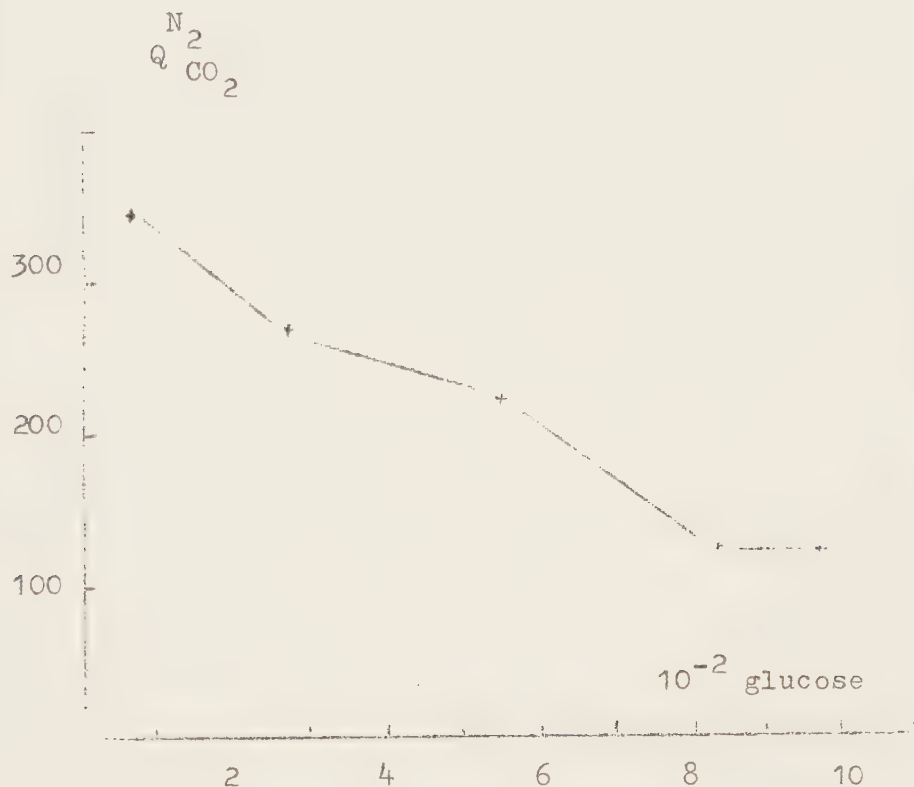


Figure 8: Influence de la concentration en glucose sur la vitesse de fermentation du maltose.

A cet effet les cellules sont récoltées respectivement après une et deux générations sur glucose 10%, puis ensemencées sur des milieux contenant 0,15% et 2% de glucose à une d.o. de C,100.

Les déterminations manométriques ($Q_{CO_2}^{N_2}$ maltose) se font ensuite après 30, 60 et 120 minutes de ²croissance correspondant à des d.o. de 0,110; 0,150; 0,210.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 10.

Tableau 10.

Evolution du pouvoir fermentaire sur maltose au cours de

la croissance sur glucose 0,15% après répression par le glucose 10%

Temps d'incubation en heures maltose 4%	Départ gluc. 10%	temps de croissance et concentration en glucose					
	1ère génération	30 minutes		60 minutes		120 minutes	
		0,15%	2%	0,15%	2%	0,15	2%
1	340	427	307	418	259	376	228
2	500	452	400	337	474	364	456
	2ème génération						
1	230	520	230	426	215	398	180
	562	569	550	456	459	405	475

Nous remarquons que la valeur maximum est déjà obtenue après 30 minutes d'incubation en présence de glucose 0,15%. Par contre dans le cas du glucose 2% la répression est maintenue et la vitesse de fermentation diminue progressivement pour atteindre environ 50% de la valeur obtenue sur glucose 0,15%.

3) Evolution du pouvoir fermentaire sur maltose au cours de la croissance sur glucose et sur maltose après répression par le glucose 10%

Ces essais ont été effectués dans le but d'établir un parallélisme éventuel entre l'induction de la maltozymase en présence de maltose 0,15% et la stimulation du pouvoir fermentaire par le glucose 0,15%.

Nous procédons comme suit: après centrifugation et lavage des cellules récoltées respectivement après une ou deux générations sur glucose 10% celles-ci sontensemencées sur des milieux contenant 0,15% de glucose; 0,15% de maltose et 10% de glucose à une d.o.de 0,100.

Les déterminations manométriques se font ensuite après 30, 60 et 120 minutes de croissance en culture agitée et à 30°C.

Tableau 11.

Evolution du pouvoir fermentaire sur maltose au cours de la croissance sur glucose 0,15% et sur maltose 0,15% après répression par le glucose 10%.

Temps d'incubation en heures sur maltose 4%	départ gluc. 10%	temps de croissance et concentration en glucose et maltose								
		30 minutes			60 minutes			120 minutes		
		Gluc 0,15%	Malt 0,15%	Gluc 10%	Gluc 0,15%	Malt 0,15%	Gluc 10%	Gluc 0,15%	Malt 0,15%	Gluc 10%
	1ère génération									
1	210	320	325	145	351	372	152	262	314	122
2	340	349	366	270	360	369	280	235	312	248
	2ème génération									
1	120	307	297	133	325	289	120	295	371	100
2	288	445	412	250	421	382	220	342	404	200
3	422									

Il ressort de ces résultats que l'augmentation du pouvoir fermentaire en présence de l'inducteur est parallèle à celle observée dans le cas du glucose 0,15%.

La disparition de la répression catabolique pour de faibles concentrations en glucose pourrait donc s'expliquer soit par la synthèse d'un inducteur soit par l'inhibition de la synthèse d'un répresseur.

4) Influence de l'actidione et de la p. fluoro-phenylalanine sur l'évolution du pouvoir fermentaire sur maltose au cours de la croissance sur 0,15% de glucose après répression par le glucose 10%.

Nous avons voulu montrer au cours de ces essais si l'augmentation de la vitesse de fermentation après croissance en présence de glucose 0,15% était due à une synthèse "de novo" de la maltozymase ou au contraire à une activation d'enzymes préexistants.

Dans ce but nous avons effectué des incubations en présence d'actidione et de p. fluorophénylalanine.

L'actidione, antibiotique produit par streptomyces griseus (85,115) bloque non seulement la synthèse protéique mais également celle du ADN. Par contre, la synthèse de ARN n'est que partiellement inhibée. Notons encore que l'actidione agirait soit au niveau du transfert des acides aminés de l'ARN soluble aux ribosomes, soit au niveau de la polymérisation des acides aminés. (132) D'autre part la fluorophénylalanine inhibe la synthèse d'enzymes inducibles. (47)

Les conditions expérimentales sont celles utilisées précédemment.

Les incubations se font en présence de 0,15% de glucose et 0,15% de maltose avec et sans actidione. (1 p.p.m.) On détermine les pouvoirs fermentaires sur maltose après une et deux heures d'incubation aérobie à 30°C. Les résultats sont exprimés dans le tableau 12.

Tableau 12.

Influence de l'actidione (1 p.p.m.) sur l'évolution du pouvoir fermentaire sur maltose au cours de la croissance sur 0,15% de glucose et 0,15% de maltose après répression par le glucose 10%.

Temps d'incuba- tion en heures sur malto se 4%	départ glucose 10%	60 minutes d'incubation dans le milieu minéral contenant			
		Gluc. 0,15%	Gluc. 0,15% + actid.	Maltose 0,15%	Maltose 0,15% + actid.
1	106	357	82	347	159
2	383	389	94	428	242
			120 minutes		
1	217	388	78	412	215
2	501	363	87	369	234

Nous remarquons que les pouvoirs fermentaires obtenus après incubation dans le milieu contenant 0,15% de glucose en présence d'actidione sont identiques aux valeurs obtenues après répression par le glucose 10%.

Nous arrivons à la même conclusion dans le cas du maltose 0,15%. Dans ces conditions nous pouvons admettre que l'augmentation du pouvoir fermentaire après croissance sur 0,15% de glucose correspond à une synthèse de protéines actives. Nous avons vérifié cette conclusion en utilisant la p. fluorophenylalanine. (p. F.P.A)

Les conditions expérimentales sont celles utilisées ci-dessus.

La p.F.P.A. a été utilisée à une concentration de 0,02 M. Les résultats sont repris dans le tableau 13.

Tableau 13.

Influence de la p. fluorophenylalanine (0,02M) sur l'évolution du pouvoir fermentaire sur maltose au cours de la croissance sur 0, 15% de glucose et 0,15% de maltose après répression par le glucose 10%.

Temps d'incuba- tion en heures sur malto- se 4%	départ glucose 10%	90 minutes d'incubation dans le milieu minéral contenant			
		Glucose 0,15%	Glucose 0,15%+p. F.P.A.	Maltose 0,15%	Maltose 0,15%+p. F.P.A.
1	103	285	181	310	198
2	194	271	264	281	266

Ces résultats confirment ceux obtenus lors des incubations en présence d'actidione. Notons également que l'évolution de la vitesse d'utilisation du maltose après incubation sur glucose 0,15% est parallèle à celle obtenue en présence de l'inducteur.

5) Evolution du pouvoir fermentaire sur maltose en absence de multiplication cellulaire après répression par le glucose 10%.

Les conditions expérimentales sont celles utilisées précédemment sauf le milieu minéral qui est remplacé par un tampon phosphaté à pH 4,5 contenant 0,15% et 10% de glucose.

Les déterminations manométriques se font après 30, 60 et 120 minutes d'incubation.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 14.

Tableau 14.

Evolution du pouvoir fermentaire sur maltose dans un tampon phosphate après répression par le glucose 10%.

Temps d'incubation en heures sur maltose 4%	départ glucose 10%	temps d'incubation dans le temps glucosé					
		30 minutes		60 minutes		120 minutes	
		0,15%	10%	0,15%	10%	0,15%	10%
	1ère génération						
1	169	279	166	208	114	163	60
2	418	435	410	350	300	264	175
	2ème génération						
1	94	240	73	182	48	223	33
2	298	390	190	331	162	258	130
3	497						

Nous constatons que l'accroissement de la vitesse de fermentation est moins accentué en absence de multiplication cellulaire qu'après croissance dans le milieu minéral.

Le pouvoir fermentaire sur maltose diminue même sensiblement après 120 minutes d'incubation.

V. - CONCLUSIONS

L'analyse des phénomènes de répression et d'induction des enzymes intervenant dans la fermentation du maltose constitue une méthode simple, non seulement pour définir les propriétés biochimiques des levures de brasserie mais également pour contrôler leur stabilité au cours du temps.

De l'ensemble des résultats obtenus nous pouvons tirer les conclusions suivantes:

- 1) l'étude de la latence, de la cinétique de désadaptation et d'induction de la maltozymase permet de conclure à une déficience généralisée des levures basses en ce qui concerne l'utilisation du maltose. (Figure 9)

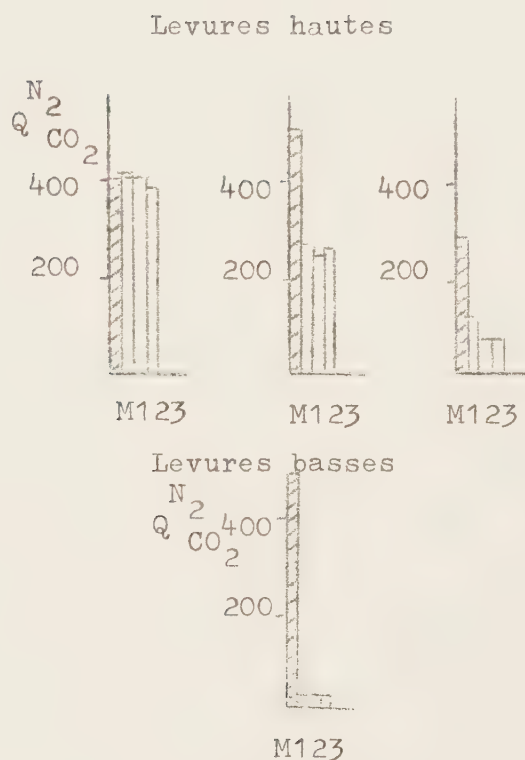


Figure 9.: Pouvoirs fermentaires ($Q_{CO_2}^{N_2}$) sur maltose de quelques souches de levures hautes et basses après croissance sur maltose (M) suivie de trois transferts sur milieu glucosé. (1; 2 et 3)

- 2) l'analyse comparée des pouvoirs fermentaires sur glucose et sur maltose permet de classer les levures hautes en trois groupes: certaines souches fermentent constitutivement le maltose, d'autres subissent une diminution de la vitesse de fermentation de 50% après un transfert sur glucose et un troisième groupe se caractérise par une désadaptation très rapide. La vitesse de fermentation se stabilisant à 25% de la valeur initiale après

le deuxième transfert sur glucose. (figure 3)

- 3) l'étude de la cinétique d'induction de la maltozymase en absence de multiplication cellulaire montre que la latence et l'accélération du $Q_{CO_2}^{N_2}$ peuvent être considérées comme des constantes de caractérisation. Nous constatons que les levures basses se comportent d'une façon très différente par rapport aux levures hautes. En effet, il faut respectivement 7 heures et 3 heures pour atteindre la vitesse d'utilisation maximum du maltose.

Les conditions qui déterminent la répression de la synthèse de la maltozymase ont été précisées dans le cas d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* (culture monospore n° 106/6/2) se caractérisant par une diminution de la vitesse de fermentation proportionnelle à l'augmentation de la masse cellulaire.

Il ressort de ces résultats que l'inhibition des enzymes permettant le transport et l'hydrolyse du maltose dépend essentiellement de la concentration en glucose du milieu de culture.

Sur un milieu contenant 2% de glucose, la vitesse de fermentation passe par un minimum après deux générations et augmente ensuite graduellement pour atteindre une valeur maximum après environ quatre générations. Si la croissance s'effectue sur 10% de glucose le pouvoir fermentaire est maintenu à une valeur minimum soit à environ 20% de la valeur obtenue après croissance en présence de l'inducteur.

Des croissances effectuées en présence de différentes concentrations de glucose ont montré que la vitesse d'utilisation du maltose est inhibée à partir de $5 \cdot 10^{-2} M$. Dans le cas de faibles concentrations de glucose ($8 \cdot 10^{-3} M$) la vitesse de fermentation est non seulement maintenue à un taux élevé mais celle-ci est également rétablie après répression par le glucose 10%.

L'actidione, qui bloque la synthèse protéique, et la p. fluorophénylalanine qui inhibe la synthèse d'enzymes inductibles

annulent l'effet du glucose 0,15%. Ces résultats sont donc en faveur d'une synthèse "denovo" de la maltozymase.

Notons enfin que la désinhibition induit par de faibles concentrations en glucose est liée à la croissance. En effet, en absence de multiplication cellulaire la répression de la fermentation du maltose n'est plus que partiellement levée par le glucose 0,15%. En prolongeant le temps d'incubation dans le tampon phosphate, cette même concentration en glucose diminue considérablement le pouvoir fermentaire sur maltose. (environ 50% après 120 minutes) L'effet répresseur du glucose 10% est également nettement accentué dans ces conditions.

Ce résultat inattendu est aussi une preuve indirecte de fait que la synthèse de la maltozymase dépend non seulement de la présence de l'inducteur mais également du taux intracellulaire de catabolites répresseurs. Ainsi en variant les possibilités de synthèse de la cellule, le glucose 0,15% peut à la fois stimuler ou inhiber la synthèse des enzymes intervenant dans l'utilisation du maltose.

+ . + . + . + . + . +

C H A P I T R E I I

CONTROLE METABOLIQUE DE LA SYNTHÈSE DE L' α GLUCOSIDASE
CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE

P L A N D E T A I L L E -----

	<u>Page</u>
I. <u>DOSAGE DE L' α GLUCOSIDASE</u>	61
A) Méthode de dosage	61
B) Préparation de l'extrait	62
C) Influence de la concentration en maltose sur l'activité de l' α glucosidase	63
D) Détermination de la constante de dissocia- tion de l' α glucosidase	64
E) Influence de la durée d'incubation en présen- ce de désoxycholate sur l'activité de l' α glucosidase	68
F) Influence de la quantité de levures sur l' activité de l' α glucosidase après incu- bation en présence de désoxycholate	69
G) Activité de l' α glucosidase après plasmolyse d'une suspension de levures par le toluol	70
H) Activité de l' α glucosidase d'un extrait obtenu après traitement aux ultrasons	71
II. <u>ETUDE DU CONTROLE DE LA SYNTHÈSE DE L' α GLUCOSIDASE PAR LE GLUCOSE</u>	71
1) Activité spécifique et totale de l' α glu- cosidase au cours de la croissance sur mal- tose	71
2) Répression de la synthèse de l' α glucosida- se par le glucose 10% dans la cas de la sou- che 106	74
3) Répression de la synthèse de l' α glucosida- se par le glucose 10% dans le cas de la sou- che 173	75
4) contrôle de la synthèse de l' α glucosidase par le glucose 0,15% et par le maltose 0,15%	

	<u>Page</u>
après répression par le glucose 10% dans le cas de la souche 106	77
III. <u>CONCLUSIONS</u>	80

+•+•+•+•+•+

CONTROLE METABOLIQUE DE LA SYNTHÈSE DE L' α GLUCOSIDASE CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Nous avons vu dans la première partie du présent travail que le glucose exerce un double contrôle sur la synthèse de la maltozymase chez *Saccharomyces cerevisiae*.

De faibles concentrations en glucose ($10^{-3}M$) stimulent la formation de cet enzyme, alors que de fortes concentrations ($10^{-1}M$) inhibent considérablement sa synthèse.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par MAC QUILLAN et HALVORSON lors de l'étude du contrôle métabolique et génétique de la synthèse de la β -glucosidase chez *Saccharomyces fragilis* x *S. dobzhanskii* (93,94) et *Saccharomyces Lactis*. (63,64) L'effet inducteur du glucose ($10^{-4}M$) quoique présentant une certaine spécificité par rapport à l'hexose, ne s'avère pas spécifique par rapport aux enzymes induits. (l'induction portant simultanément sur différentes carbohydrases)

D'autre part, l'effet répresseur n'est pas spécifique de glucose, (l'acétate et le lactate inhibent également la synthèse de la β -glucosidase) Notons encore qu'une induction préalable par le β -méthylglucoside ne rend pas le système insensible à la répression catabolique.

Dès lors deux sites de contrôle ont été envisagés par ces auteurs: un site d'induction qui agirait au niveau du gène et un site de répression qui agirait à un endroit différent du système induction-répression. (61,92)

Jusqu'à présent nos essais se sont limités à des mesures de vitesse de fermentation que nous avons considéré comme une expression quantitative du taux d'enzymes inductibles.

Dans le but de préciser le double aspect du contrôle métabolique de la fermentation du maltose par le glucose, nous avons étudié les conditions qui déterminent la synthèse de l' α -glucosidase chez la levure.

I. - DOSAGE DE L' α GLUCOSIDASE

A. Méthode de dosage:

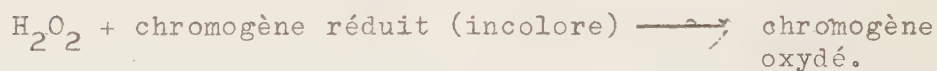
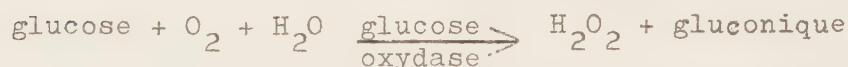
La méthode de HALVORSON et ELLIAS (49) basée sur l'hydrolyse enzymatique du p.-nitrophényl- α -D glucoside n'a pu être utilisée, le PNPG ne se trouvant pas dans le commerce et sa préparation présentant de grandes difficultés techniques.

Ces raisons nous ont amené à mettre au point une autre méthode de dosage.

a) Principe:

Le maltose est hydrolysé par l' α glucosidase à pH 6,8. La réaction est arrêtée par ajout de tris (hydroxyméthyl) aminométhane (TRIS) et l'activité de l'hexokinase est bloquée en présence d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA). Ceci permet le dosage du glucose par la glucose oxydase. (glucostat spécial ne contenant pas de maltase: Worthington Biochemical Corp.)

Les réactions s'établissent comme suit:



Le chromogène oxydé présente un maximum d'absorption à 450 m μ .

b) Conditions expérimentales:

On prépare les solutions suivantes:

Solution A.: (contenant le maltose)

maltose (1,5 M/L)	1	cc
glutathion (1 mg/cc)	1	cc
tampon phosphate 0,067 M-pH 6,8	4	cc
bleu de bromothymol 0,02%	0,1	cc
eau bidistillée	3,9	cc
E.D.T.A. 0,015 M		

Solution B.: (contenant le glucostat)

dissoudre séparément la glucose oxydase et le chromogène dans 50 cc d'une solution contenant le TRIS. Cette solution est préparée en dissolvant 61 gr. de TRIS dans 85 cc d'HCl 5N et en portant à 1 litre avec de l'eau bidistillée. Le pH est ajusté à 7. La glucose oxydase et le chromogène sont conservés à froid et mélangés à partie égale au moment de l'emploi.

Le système complet de dosage contient:

Solution A (maltose)	0,1	cc
extrait	0,05	cc (0,1 mg protéines par cc)

Après 5 heures d'incubation à 30°C. on ajoute 3 cc de la solution B contenant le TRIS.

Après 2 heures d'incubation on détermine le glucose formé en mesurant la densité optique à 450 m μ . A cet effet on utilise une courbe étalon pour le glucose. (figure 1) Le blanc est traité de la même façon et contient tous les composants sauf l'enzyme.

L'activité de l' α glucosidase est exprimée par le nombre de μ moles de glucose formé par heure et par mg de protéines.

Le dosage des protéines se fait par la méthode du biuret; la densité du complexe coloré protéine-cuivre est mesurée au spectrophotomètre Unicam à 545 m μ .

B. Préparation de l'Extrait: différentes méthodes ont été utilisées.

1.-Ultrasons:

Après centrifugation de la culture à 0°C à 3.000g, les culots de levure sont remis en suspension, 5g de poids humide environ étant repris dans 15 cc de tampon phosphate 0,067 à pH 6.8.

Cette suspension est alors soumise aux ultrasons pendant 10 minutes à 0°C dans un appareil Raytheon

DF/101. (250 W-10Kc.) L'extrait est ensuite centrifugé à 30.000 g pendant 5 minutes. Le liquide surnageant qui constitue l'extrait est conservé à 0°C.

2.-Destruction des membranes cellulaires par le Toluol:

Après centrifugation de la culture à 0°C à 3.000g les culots de levure sont lavés trois fois à l'eau distillée et finalement séchés sur G 4.

0,2 cc de toluol sont ajoutés par gramme de levure pressée. Les suspensions sont ensuite incubées à 30°C sans agitation pendant 3, 6 et 15 heures et finalement centrifugées après dilution par 2 cc de tampon phosphate 0,067 M pH 6,8. L'activité de l' α glucosidase du surnageant est dosée par le réactif au glucostat après décantation du toluol.

3.-Destruction des membranes cellulaires par le desoxycholate:

après centrifugation et lavages de la culture à 0°C les culots sont séchés sur G 4 et incubés sans agitation à 30°C pendant 1, 2, 3, 4, 5 et 7 heures en présence de 3 cc de desoxycholate de sodium 0,01 M. L'activité de l' α glucosidase est ensuite dosée dans le surnageant après centrifugation.

C. Influence de la concentration en maltose sur l'activité de l' α -glucosidase. (courbe de saturation)

On prépare les dilutions suivantes de manière à avoir: 1,69; 2,81; 4,95; 7,50; 9,90; 13,50; 15,0 et 17,50 μ moles de maltose par 0,15 cc.

Après croissance sur maltose, les cellules sont récoltées par centrifugation, ensuite incubées pendant 3 heures à 30°C en présence de 3 cc de desoxycholate de sodium 0,01 M. Les surnageants après centrifugation sont dilués à l'aide d'un tampon phosphate 0,067 M pH 6,8 jusqu'à une concentration finale en protéines de 0,12 mg par cc; le tableau exprime l'activité de l' α glucosida-

se après 5 minutes d'incubation à 30°C.

Tableau 15.

μM maltose par 0,15 cc	Maltose 10^{-2} M/L	μM glucose fer- mées par 0,15 cc	glucose 10^{-4} M/L
1,69	1,13	0,023	1,54
2,81	1,88	0,037	2,46
4,95	3,3	0,055	3,66
7,50	5,0	0,072	4,80
9,90	6,5	0,080	5,34
13,50	9,0	0,086	5,70
15,0	10,0	0,086	5,70
17,50	11,7	0,085	5,66

Expression de l'activité spécifique pour une concentration saturante en substrat:

1 cc extrait forme 1,72 μM de glucose par 5 minutes

$\frac{1,72}{0,12} = 14,3$ μM de glucose formés par 5 min. et mg. de protéines, d'où
 $14,3 \times 12 = 172$ μM de glucose formés par heure et par mg de protéines.

D. Détermination de la constante de dissociation de l' α glucosidase:

a) Méthode de Michaëlis:

$$v = \frac{V \cdot S}{K_m + S} \quad \text{ou} \quad K_m = S \left(\frac{V}{v} - 1 \right)$$

Puisque K_m et V sont constants, l'équation est celle d'une hyperbole rectangulaire. Lorsqu'on atteint $v = \frac{V}{2}$, la concentration en substrat donne la valeur de K_m .

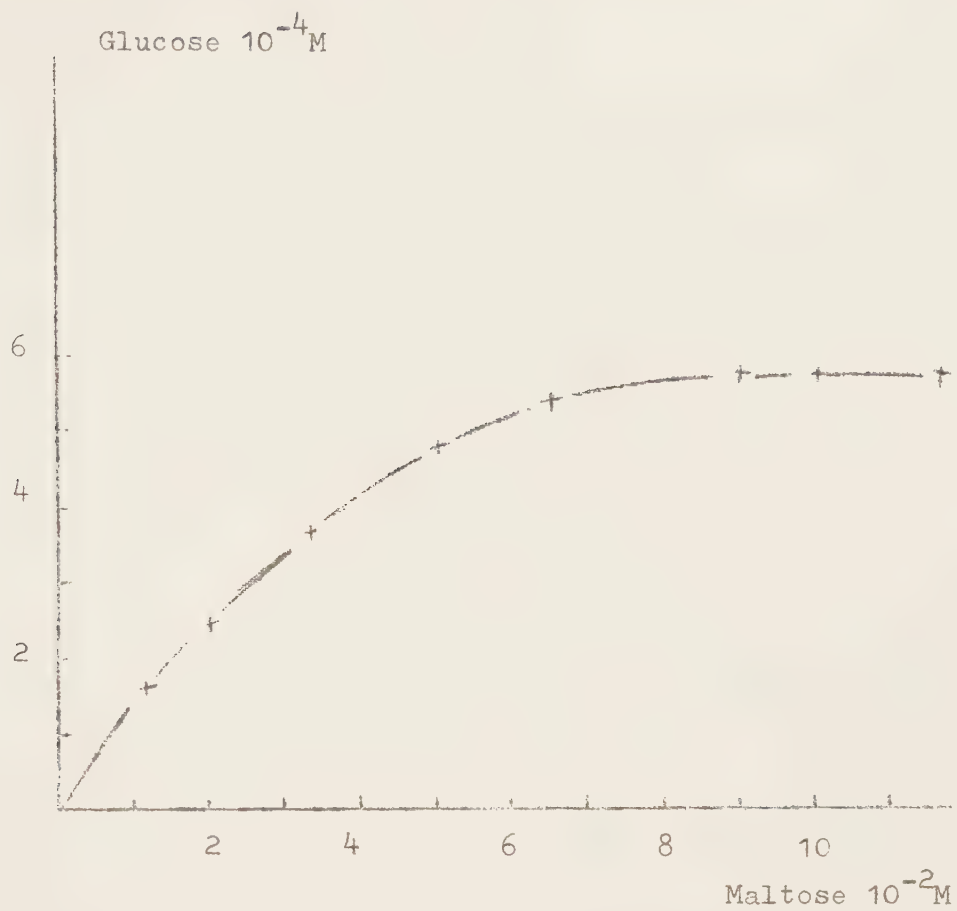


Figure 10.: Courbe de saturation en substrat: α glucosidase

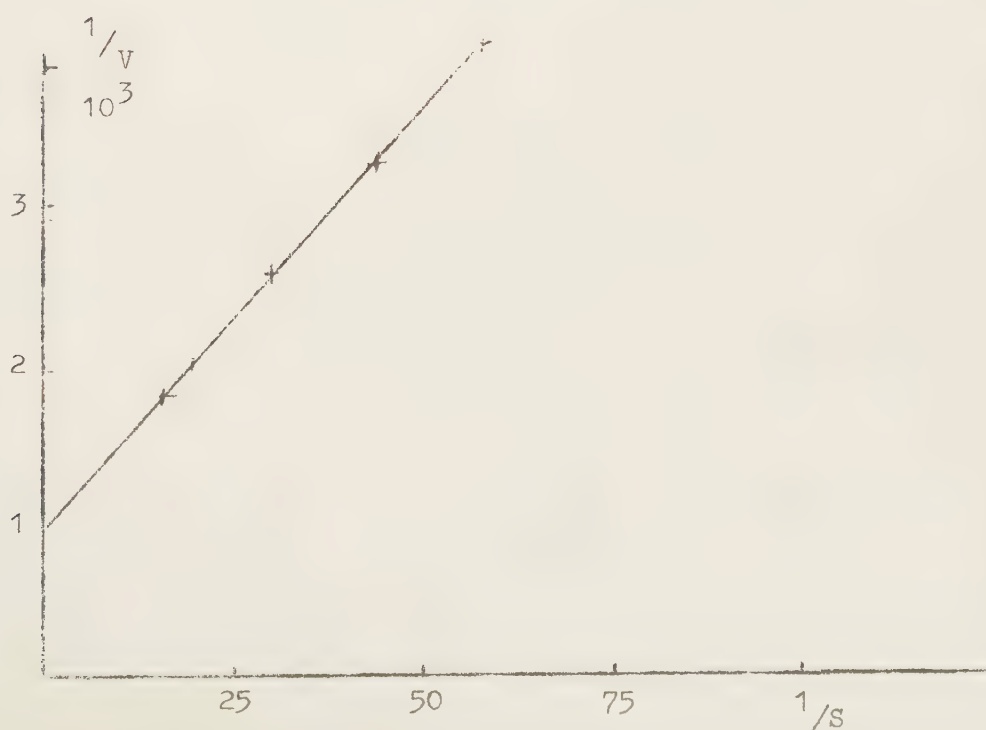


Figure 11.: Détermination de K_M : α glucosidase

L'examen de la figure 10, nous donne pour V une valeur de $5,710^{-4}$ M/L.

soit $V/2 = 2,85.10^{-4}$ M/L; d'où $K_m = 2,4.10^{-2}$ M/L.

b) Méthode de Lineweaver et Burk: (82)

En prenant l'inverse de l'équation de Michaëlis

$v = \frac{V.S.}{K_m + S}$ on obtient une équation:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{V}$$

En mettant $1/v$ par rapport à $1/S$, on obtient une droite avec un coefficient angulaire $= K_m/V$. Puisque V peut être déterminé par l'intersection de la droite avec l'ordonnée, il en résulte la valeur de K_m (figure 11)

$$\text{Tg } \alpha = \frac{2750}{50} = 55 = \frac{K_m}{V}$$

$$\frac{1}{V} = 1000 \text{ ou } V = 0,001 \text{ M/L}$$

$$K_m = 55 \times 0,001 = 0,055 \text{ M/L} = 5,5.10^{-2} \text{ M/L}$$

Une autre méthode consiste à multiplier la dernière équation obtenue par S:

$$\frac{S}{v} = S \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V}$$

En mettant $\frac{S}{v}$ par rapport à S, on obtient une droite dont le coefficient angulaire donne la valeur de $1/V$. L'intersection avec l'ordonnée donne K_m/V d'où on peut calculer la valeur de K_m . (figure 12)

$$\text{Tg } \alpha = \frac{50}{0,05} = 1000 = \frac{1}{V}$$

$$V = \frac{1}{1000} = 0,001 \text{ M/L}$$

$$y = \frac{K_m}{V} = 57$$

$$K_m = 57 \times 0,001 = 0,057 \text{ M/L} = 5,7.10^{-2} \text{ M/L}$$

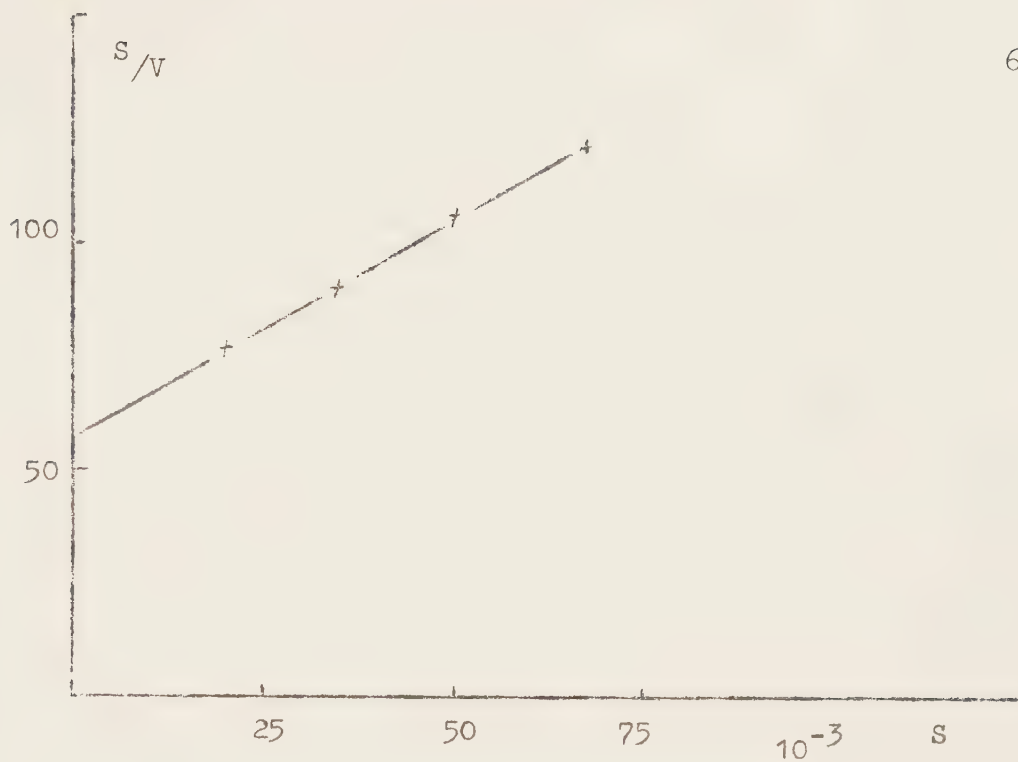


Figure 12.: Détermination de K_M : α glucosidase

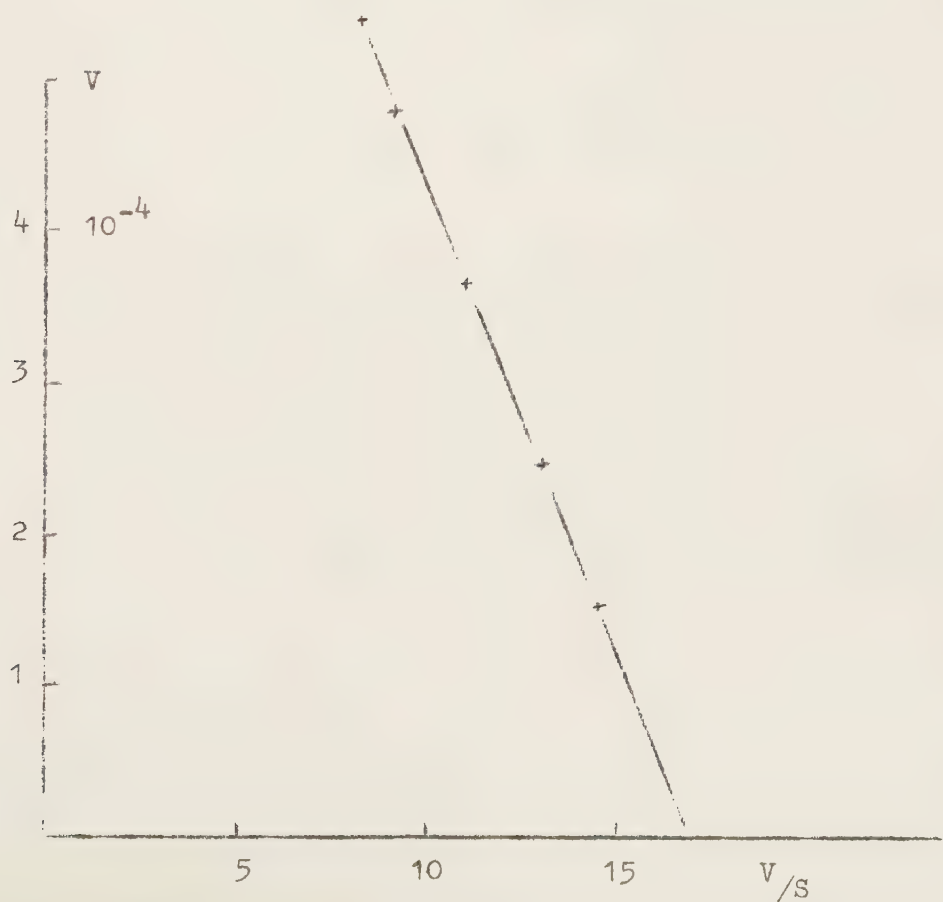


Figure 15.: Détermination de K_M : α glucosidase

c) Méthode de Eadie: (28)

$$V = v + \left(\frac{V}{S} \right) K_m$$

En mettant V par rapport à V/S , on obtient une droite dont l'intersection avec l'ordonnée donne V et l'intersection avec l'abscisse V/K_m d'où on peut calculer la valeur de K_m (figure 13)

$$V = 0,001 \text{ M/L et } V/K_m = 0,017$$

$$K_m = \frac{0,001}{0,017} = 0,059 \text{ M/L} = 5,9 \cdot 10^{-2} \text{ M/L}$$

En conclusion nous pouvons admettre une valeur de $5,7 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ pour la constante de dissociation de l' α glucosidase.

Notons que nous avons négligé le chiffre obtenu par la méthode de Michaëllis, cette méthode étant la moins précise.

E. Influence de la durée d'incubation en présence de desoxycholate sur l'activité de l' α glucosidase.

Après 12 heures de croissance aérobie sur maltose 2%, les cellules sont centrifugées et remises en suspension à raison de 1 gr de levure pressée par 3 cc de desoxycholate 0,01 M.

Après différents temps d'incubation à 30°C les cellules sont centrifugées et l'activité de l' α glucosidase est dosée sur les surnageants.

Le système complet contient:

0,1 cc de substrat ($13,3 \cdot 10^{-2} \text{ M/L}$ de maltose)

0,05 cc d'extrait (0,1 mg de protéines par cc)

Les résultats sont exprimés dans le tableau 16.

Tableau 16.

Influence de la durée d'incubation en présence de desoxycholate sur l'activité de l' α glucosidase.

Temps d'action du desoxycholate (h)	mg de protéines par cc de surnageant	μ M de glucose formés par h. et par mg de protéines
1	1,48	6,4
2	5,2	100
3	8,0	224
4	12,8	208
5	11,1	218
7	12,9	206

Nous remarquons que l'activité maximum de l' α glucosidase est atteinte après 3 heures d'incubation.

F. Influence de la quantité de levures sur l'activité de l' α glucosidase après incubation en présence de desoxycholate:

Les conditions expérimentales sont celles utilisées ci-dessus. Après centrifugation les cellules sont remises en suspension à raison de 0,1; 0,5; 1 et 2 gr de levure pressée par 3 cc de desoxycholate 0,01 M. La durée d'incubation a été fixée à 3 heures.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 17.

Tableau 17.

Influence de la quantité de levures sur l'activité de l' α glucosidase après 3 heures d'incubation en présence de desoxycholate.

Quantité de levures en gr.	mg de protéines par cc de surnageant	μ M de glucose formés par heure et par mg de protéines
0,1	1,36	49
0,5	3,68	176
1	6,14	204
2	10,6	242

Notons que les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant 1 gr de levures.

G. Activité de l' α Glucosidase après plasmolyse d'une suspension de levures par le toluol.

Les conditions de croissance sont celles utilisées ci-dessus. Après centrifugation on ajoute 0,2 cc de toluol par gr de levures. Les suspensions sont ensuite incubées à 30°C pendant 3,7 et 15 heures. Les cellules sont remises en suspension dans 2 cc de tampon phosphate à 0,067 M à pH 6,8 et centrifugées. L'activité de l' α glucosidase est ensuite dosée sur les surnageants comme indiqué ci-dessus.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 18.

Tableau 18.

Influence de la durée d'incubation sur l'activité de l' α glucosidase après plasmolyse par le toluol

Durée d'incubation en heures	mg de protéines par cc de surnageant	μ M de glucose formé par h. et par mg de protéines
3	2,4	46
7	4,5	276
15	10	282

Nous constatons que l'activité spécifique de l' α glucosidase n'augmente plus après 7 heures d'incubation.

H. L'activité de l' α glucosidase d'un extrait obtenu après traitement aux ultrasons

Les conditions expérimentales sont celles utilisées précédemment. Les résultats sont exprimés dans le tableau 19.

Tableau 19.

L'activité de l' α glucosidase après traitement d'une suspension de levures aux ultrasons.

mg de protéines par cc de surnageant	μ M de glucose formé par heure et par mg de protéines
47,5	187

II. - ETUDE DU CONTROLE DE LA SYNTHÈSE DE L' α GLUCOSIDASE PAR LE GLUCOSE

1) Activité spécifique et totale de l' α glucosidase au cours de la croissance sur maltose

Afin de vérifier la validité de la technique employée nous avons étudié l'activité de l' α glucosidase au cours d'une croissance en présence de l'inducteur. Ces conditions devraient en effet nous permettre d'établir une relation linéaire entre l'activité totale de l'enzyme et l'accroissement de la masse cellulaire. Les essais ont été effectués avec les souches 106 et 173.

a) souche 106:

nous opérons comme suit: une préculture aérobie de 12 h. sur maltose 2% est utilisée pour ensemen-
cer le même milieu à une d.o. de 0,175. L'activité to-
tale de l' α glucosidase est ensuite déterminée au
cours de la croissance exponentielle en prélevant
pour chaque mesure le même volume de la culture. Les
cellules sont récoltées par centrifugation lavées
trois fois à l'eau physiologique à 0°C. Le culot est
repris par 0,2 cc de toluol et incubé pendant 14 heu-
res à 30°C. Les cellules sont remises en suspension
dans 2 cc de tampon phosphate 0,067 M. pH 6,8. Après
centrifugation, l'activité de l' α glucosidase est
dosée sur les surnageants comme indiqué précédemment.
L'extrait est dilué de façon à avoir 0,1 mg de protéi-
nes par cc.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 20.

Tableau 20.

Evolution de l'activité de l' α glucosidase au cours
d'une croissance sur maltose 2% dans le cas de la sou-
che 106.

d.o.	N ₂ Q CO ₂ malt.	mgr protéi- nes cc.sur- nageant	α glucosidase	
			μ Mgl.formé H/mg prot.	mM gl.formé h/cc surna- geant
0,320	390	16	358	5,72
0,500	420	23	390	10,00
0,650	487	31,5	434	13,6

Nous constatons que l'accroissement de l'activité
de l' α glucosidase est parallèle à celle de la mas-
se cellulaire. (voir figure 14)

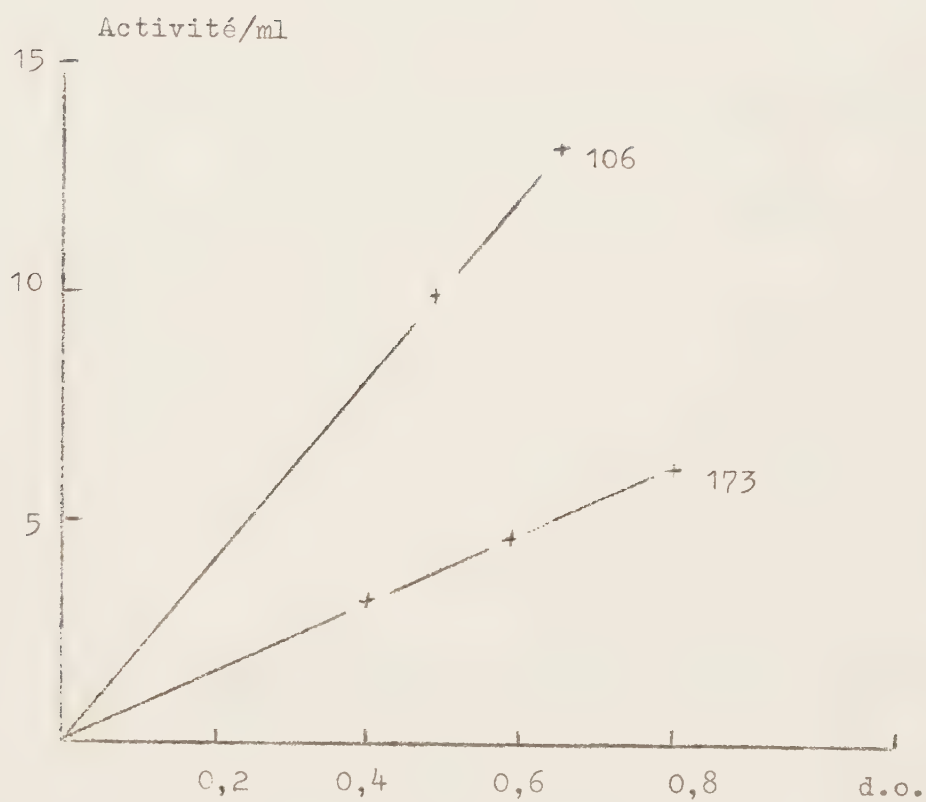


Figure 14.: Evolution de l'activité de α glucosidase au cours d'une croissance sur 2% maltose dans le cas des souches 106 et 173.

b) souche 173:

Les résultats sont exprimés dans le tableau 21.

Tableau 21

Evolution de l'activité de l' α glucosidase au cours d'une croissance sur maltose 2% dans le cas de la souche 173.

d.o.	N ₂ Q CO ₂ malt.	mgr protéi- nes cc. sur- nageant	α glucosidase	
			μ M gl.for- mé h/mg. prot.	mM gl.formé h/cc.surna- geant
0,400	288	9,6	254	3,16
0,600	295	13,5	280	5,1
0,780	310	16,8	329	6,04

Ces résultats confirment ceux obtenus dans le cas de la souche 106. Notons également que l'activité spécifique est plus faible que celle obtenue dans le cas de la souche 106 (figure 14)

2) Répression de la synthèse de l' α glucosidase par le glucose 10% dans le cas de la souche 106

Les cellules sont récoltées en phase exponentielle de croissance sur maltose 2% lavées trois fois à l'eau physiologique à 0°C puis ensemencées à une d.o. de 0,150 sur milieu minéral contenant 10% de glucose. L'activité de l' α glucosidase est ensuite dosée en fonction de l'augmentation de la masse cellulaire. Les résultats sont exprimés dans le tableau 22.

Tableau 22.

Répression de la synthèse de l' α glucosidase par le glucose 10% après induction par le maltose 2% dans le cas de la souche 106.

d.o.	N ₂ Q CO ₂ malt.	mg. de prot. cc. de surn.	α glucosidase	
			μ M gluc. formé h/mg prot.	mM gluc. formé h/cc surnageant
Maltose 2%				
0,150	434	12	450	3,2
Transfert s/glucose 10%				
270	151	19,8	194	3,84
440	143	31,2	140	3,20
570	131	43,1	76,7	3,17

Nous constatons que l'inhibition de la synthèse de l' α glucosidase est complète pour une concentration de $5 \cdot 10^{-1}$ M de glucose. (fig.15) D'autre part l'activité spécifique diminue graduellement et parallèlement à la diminution de la vitesse de fermentation. En conclusion lorsque la croissance de la souche 106 s'effectue sur un milieu contenant 10% de glucose, la diminution de la vitesse d'utilisation du maltose et de l'activité spécifique de l' α glucosidase s'expliquerait par l'arrêt du taux différentiel de synthèse de l'enzyme.

3) Répression de la synthèse de l' α glucosidase par le glucose 10% dans le cas de la souche 173

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles utilisées dans le cas de la souche 106.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 23.

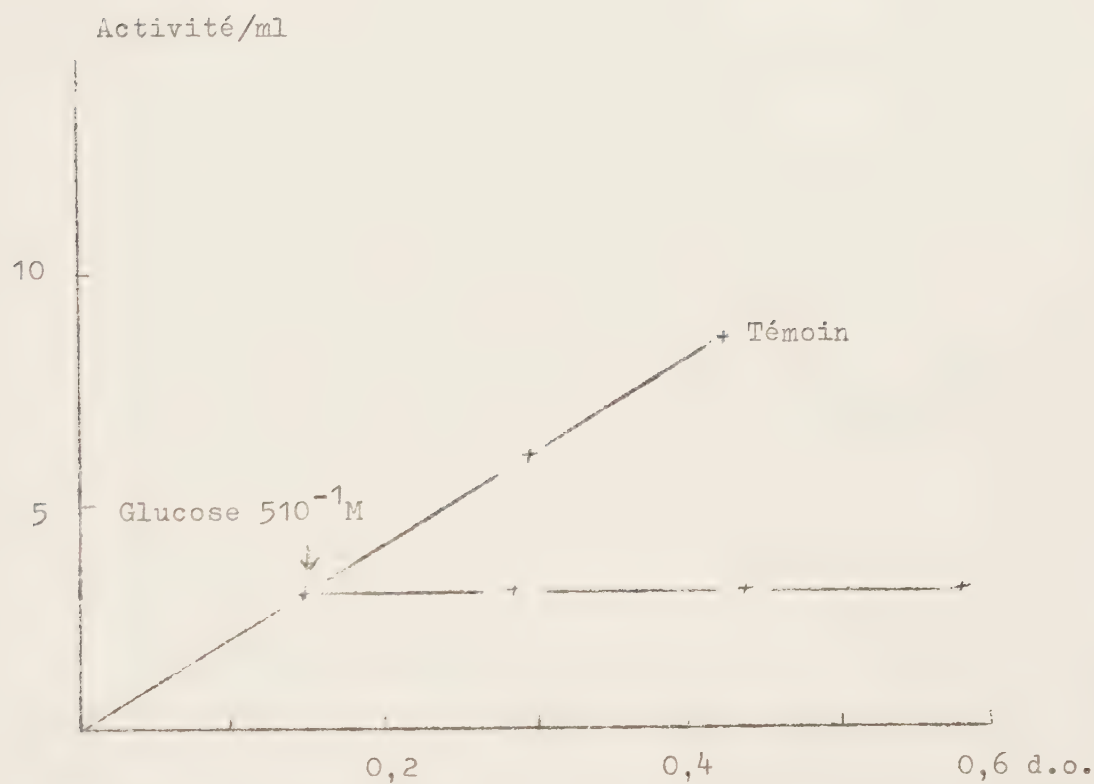


Figure 15.: Inhibition de la synthèse de l' α glucosidase par le glucose 10% dans le cas de la souche 106.

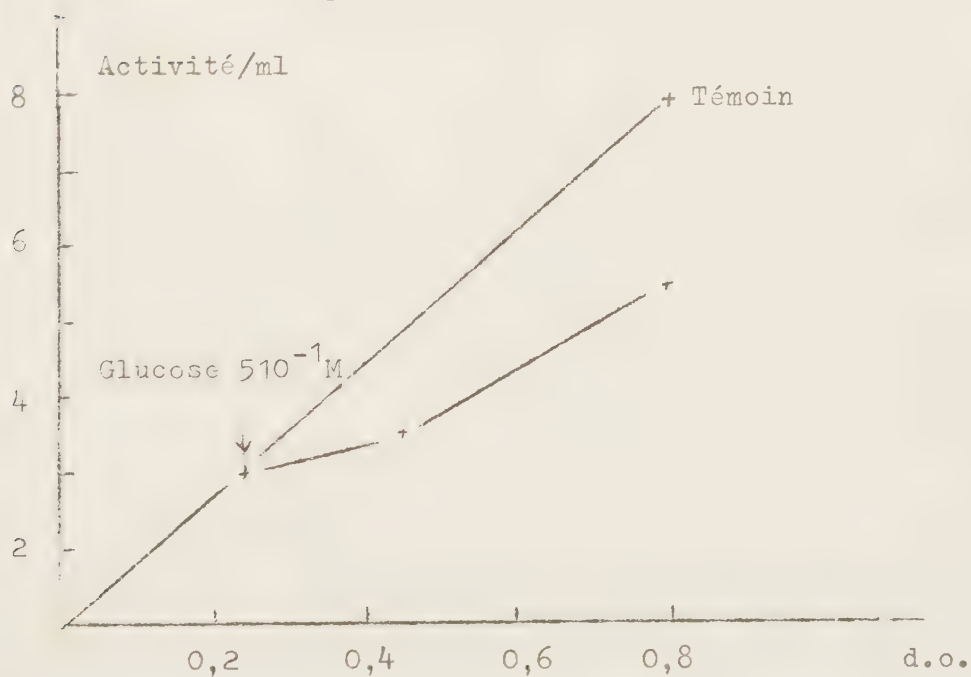


Figure 16.: Influence du glucose 10% sur la synthèse de l' α glucosidase dans le cas de la souche 173.

Tableau 23.

Répression de la synthèse de l' α glucosidase par le glucose 10% après induction par le maltose 2% dans le cas de la souche 173.

d.o.	N ₂ Q CO ₂ malt.	mg de prot. cc.de surn.	α glucosidase	
			μ M gluc.for- mé h/mg prot.	mM gluc.for- mé h/cc.surn.
maltose 2%				
0,250	350	7,5	322	2,0
transfert s/gluc.10%				
0,430	322	10,8	286	2,50
0,800	301	17,5	252	4,50

Nous remarquons que le pouvoir fermentaire calculé après une heure, reste stable, au cours des transferts successifs sur milieu glucosé à 10%.

Par contre l'activité spécifique de l' α glucosidase diminue. Notons également que le taux différentiel de synthèse diminue légèrement après une génération sur glucose pour augmenter sensiblement après la deuxième génération. (figure 16)

La discontinuité entre l'évolution du pouvoir fermentaire et celle de l' α glucosidase pourrait s'expliquer par la constitutivité de la maltoperméase tout en admettant une activité non limitante de l' α glucosidase.

- 4) Contrôle de la synthèse de l' α glucosidase par le glucose 0,15% et par le maltose 0,15% après répression par le glucose 10% dans le cas de la souche 106.

Nous procédons comme suit: les cellules sont récoltées en phase exponentielle de croissance sur maltose 2%, lavées trois fois à l'eau physiologique à 0°C puis

ensemencées sur un milieu minéral contenant 10% de glucose à une d.o. de 0,180.

Après deux générations, les cellules sont centrifugées, lavées et ensemencées à une d.o. de 0,320 respectivement sur glucose 0,15% et maltose 0,15%.

L'activité de l' α glucosidase est ensuite dosée dans chaque cas en fonction de l'accroissement de la masse cellulaire.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 24.

Tableau 24.

Evolution de l'activité de l' α glucosidase au cours de la croissance sur glucose 0,15% et sur maltose 0,15% après répression par le glucose 10%.

d.o.	N ₂ Q CO ₂ malt.	mg prot. cc.surn.	α glucosidase	
			μ M gl. formé h/mg protéine	mM gl.formé h/cc.surnageant
maltose 2%				
0,180	442	11	398	3,5
Transfert/ gluc.10% à d.o. 0,180				
0,320	180	19	122	3,2
0,650	120	34	96	3,7
Transfert s/gluc.0,15% à d.o.0,320				
0,450	392	24	137	4,2
0,540	378	29	180	5,4
Transfert s/malt.0,15% à d.o.0,320				
0,370	411	21	131	3,9
0,520	433	2,9	175	5,2

Le but de cette expérience consistait à vérifier dans quelle mesure la stimulation du pouvoir fermentaire par le glucose 0,15% pouvait s'expliquer par un accroissement parallèle de l'activité de l' α glucosidase.

Notons tout d'abord que le glucose 0,15% produit un effet semblable sur l'activité de la maltase à celui observé lors de la synthèse induite de l'enzyme en présence de maltose 0,15% (fig.17)

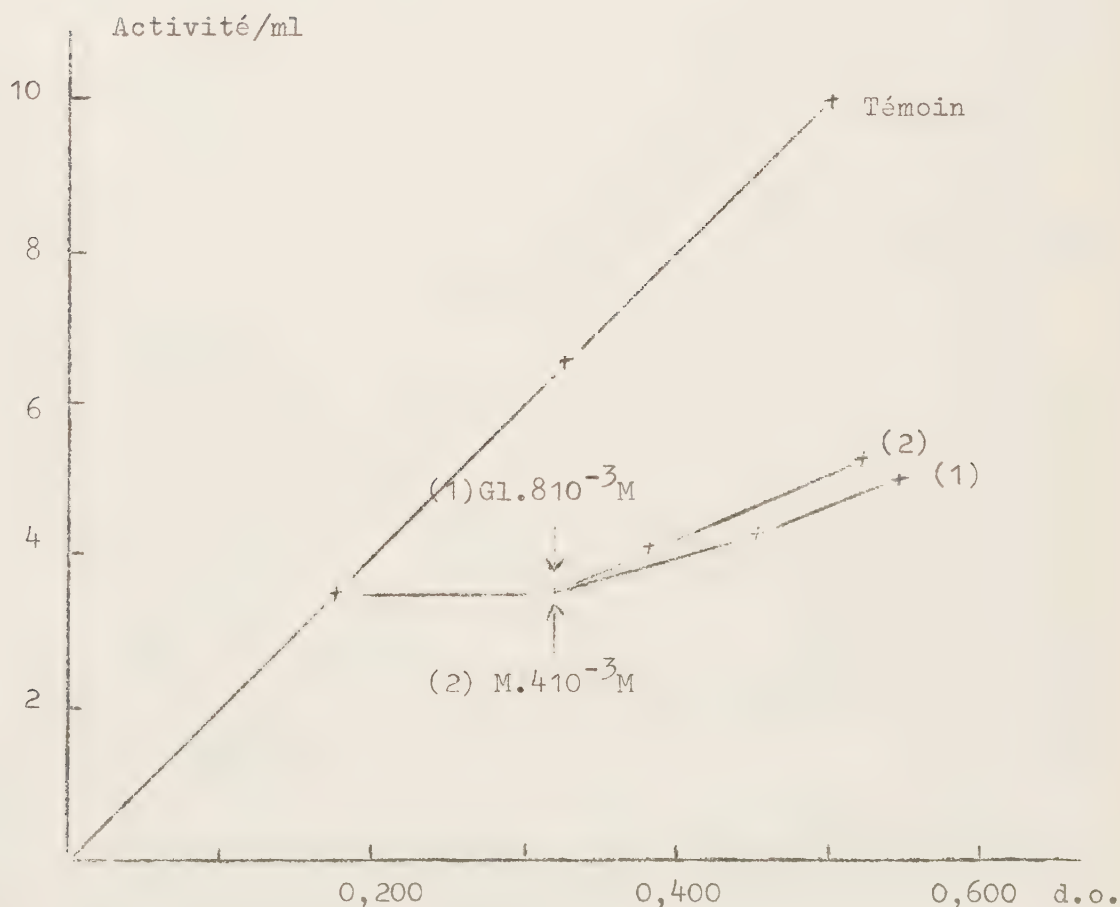


Figure 17.: Inhibition et induction de la synthèse de l' α glucosidase par le glucose.

Toutefois, la vitesse d'utilisation du maltose atteint déjà la valeur maximum après 60 minutes d'incubation et ceci quelque soit la source carbonée de culture utilisée. (glucose ou maltose)

Dans ces mêmes conditions nous obtenons un accroissement de l'activité de l' α glucosidase d'environ 20%. Il semble donc probable que le développement du système enzymatique s'explique par une séquence d'inductions.

La première étape serait la biosynthèse de la maltoperméase qui induirait à son tour celle de l' α glucosidase. Le mécanisme serait le même lors de l'incubation en présence de glucose 0,15%. Ces résultats nous permettent de dissocier répression et induction par l'action que chaque phénomène exerce sur le ou les enzymes touchés. En effet au cours de la répression il y aurait inhibition simultanée de la biosynthèse de la perméase et de la maltase, par contre le début de l'induction se caractériserait par une synthèse préférentielle de la perméase.

III. - CONCLUSION

Dans le but d'établir une relation entre la vitesse de fermentation et l'activité de l' α glucosidase nous avons dosé l'activité de cet enzyme après répression par le glucose 10%. L'addition du glucose en absence de l'inducteur se traduit par un arrêt du taux différentiel de synthèse de l' α glucosidase. Notons encore que l'activité spécifique et le pouvoir fermentaire diminuent proportionnellement.

L'effet du glucose 10% pourrait s'expliquer par la formation d'un répresseur qui inhiberait dans ce cas spécifiquement la synthèse de la perméase du maltose et de l' α glucosidase.

Par contre aucune proportionnalité n'a été constatée entre l'augmentation de la vitesse de fermentation et celle

de l'activité de la maltase au cours de l'induction par le maltose. Ceci nous amènerait à considérer le développement des systèmes enzymatiques intervenant dans la fermentation du maltose comme une séquence d'inductions. Par conséquent la synthèse de la perméase pourrait être considéré comme la première étape de l'induction.

HARRIS et MILLIN (60) ont étudié la synthèse induite de la maltozymase en absence de multiplication cellulaire. Ces auteurs ont montré que certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* se caractérisent par une induction séparée de la perméase et de l' α glucosidase. Ces résultats pourraient s'expliquer soit par une vitesse de synthèse différente soit par l'existence de deux répres-seurs distincts.

Revenons maintenant à l'effet produit par le glucose 0,15% sur la synthèse de l' α glucosidase après répression par le glucose 10%. Les résultats obtenus ont montré que la synthèse différentielle reprend dès l'ad-dition du glucose et ceci au même taux que celui observé dans le cas du maltose 0,15%.

Il est bien évident que le mécanisme doit être différent. En effet, nous ne pouvons pas considérer le glucose à la fois comme répresseur et inducteur. Plusieurs auteurs ont montré (54, 65, 140, 145) que de faibles quantités de glucose stimulent le mécanisme d'induction en four-nissant l'énergie nécessaire pour la synthèse enzymati-que.

Notons toutefois que le phénomène étudié dans le présent travail est entièrement différent puisque la synthèse de l' α glucosidase s'effectue en absence de l'induc-teur.

Un cas similaire a été décrit par MAC QUILLEN, WINDERMAN et HALVORSON. (92) Ils ont montré que la synthèse diffé-rentielle de la β glucosidase chez la levure dépend de la

concentration en glucose du milieu de culture.

Nous pourrions admettre que lorsque la croissance s'effectue sur 0,15% de glucose il y a peu ou pas d'accumulation de métabolites intermédiaires. En assimilant le corépresseur à un de ces métabolites nous pourrions attribuer l'influence de faibles concentrations en glucose sur la synthèse de l' α glucosidase à une suppression ou à une levée de la répression catabolique.

+ . + . + . + . + . +

C H A P I T R E I I I

ETUDE DE LA REGULATION DU METABOLISME FERMENTAIRE EN

ABSENCE DE MULTIPLICATION CELLULAIRE

P L A N D E T A I L L E

	<u>Page</u>
INTRODUCTION	86
I. <u>VARIATIONS DU METABOLISME FERMENTAIRE AU</u> <u>COURS DU CYCLE DE LA CROISSANCE EN ANAEROBIOSE</u>	87
II. <u>VARIATIONS DU METABOLISME FERMENTAIRE AU COURS</u> <u>DE LA PHASE DE LATENCE</u>	88
III. <u>VARIATIONS DU METABOLISME FERMENTAIRE AU COURS</u> <u>DE LA CROISSANCE ANAEROBIE EN PRESENCE D'ACTI-</u> <u>DIONE</u>	92
IV. <u>VARIATIONS DU METABOLISME FERMENTAIRE EN ABSEN-</u> <u>CE D'UNE SOURCE D'AZOTE</u>	94
A. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Yeast Foam)	95
1) <u>croissance aérobie:</u>	95
a) tampon glucosé	95
b) tampon non glucosé	97
2) <u>croissance anaérobie:</u>	98
a) tampon glucosé	98
b) tampon non glucosé	99
B. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levure haute)	100
1) <u>croissance aérobie:</u>	100
a) tampon glucosé	100
b) tampon non glucosé	101
2) <u>croissance anaérobie:</u>	103
a) tampon glucosé	103
b) tampon non glucosé	104
C. <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> (levure basse)	105
1) <u>croissance aérobie</u>	105
a) tampon glucosé	105
b) tampon non glucosé	106
2) <u>croissance anaérobie:</u>	106
a) tampon glucosé	106
b) tampon non glucosé	107

V. <u>INFLUENCE DES ACIDES AMINES SUR LA REVERSIBILITE DE LA PERTE DE LA CAPACITE FERMENTAIRE</u>	108
a) influence de la recharge de la réserve d'acides aminés libres sur le rétablissement du pouvoir fermentaire	109
b) influence de l'irradiation dans l'ultraviolet sur l'adaptation à la fermentation du glucose	110
VI. <u>VARIATIONS ENZYMATIQUES DANS LE METABOLISME FERMENTAIRE</u>	114
A. <u>Hexokinase</u>	116
1) principe et technique de dosage	116
a) conditions de dosage enzymatique	116
b) préparation de l'extrait	117
2) résultats	118
a) variations de l'activité de l'hexokinase au cours du cycle de la croissance en anaérobiose	118
b) variations de l'activité de l'hexokinase au cours de la croissance anaérobie en présence d'actidione	119
B. <u>Aldolase</u>	121
1) principe et technique de dosage	121
a) conditions de dosage enzymatique	123
b) préparation de l'extrait	123
2) résultats	123
a) variations de l'activité de l'aldolase au cours du cycle de la croissance en anaérobiose	123
b) variations de l'activité de l'aldolase au cours de la croissance anaérobie en présence d'actidione	125
C. <u>α Glucosidase</u>	126
1) principe et techniques de dosage	127
2) résultats: variations de l'activité de l' α glucosidase au cours du cycle de la croissance en anaérobiose	127
VII. <u>CONCLUSIONS.</u>	129

ETUDE DE LA REGULATION DU METABOLISME FERMENTAIRE EN ABSENCE DE MULTIPLICATION CELLULAIRE

INTRODUCTION

Les nombreux systèmes enzymatiques qui déterminent les caractéristiques physiques (106, 107) et métaboliques (31) de la levure subissent des variations quantitatives au cours du cycle de la croissance.

L'évolution du métabolisme oxydatif de *Saccharomyces Carlsbergensis* au cours de la croissance aérobie sur glucose en est un exemple et souligne l'importance du phénomène. Ainsi le pouvoir respiratoire d'une même souche ayant crû dans des conditions d'aération maximum varie de 10 à 100 avant et après diauxie au cours de la phase exponentielle de croissance. (44, 45)

L'inductibilité des enzymes intervenant dans l'utilisation du maltose et du maltotriose implique nécessairement que ces sucres ne peuvent être fermentés à une vitesse maximum qu'après croissance préalable sur un de ces deux substrats. Il en résulte des variations importantes du métabolisme fermentaire au cours de la dégradation anaérobie des sucres du moût.

Toutefois l'induction et la répression de la synthèse de l' α glucosidase et de la perméase du maltose et du maltotriose ne sont pas les seuls facteurs qui limitent la vitesse de fermentation.

En effet, HARRIS et MILLIN (58) en étudiant l'évolution du pouvoir fermentaire de la levure au cours d'une fermentation industrielle, observent une diminution considérable de la vitesse de fermentation à la fin de chaque cycle. La localisation de la déficience apparue dans la chaîne des enzymes de la fermentation alcoolique n'a pas été envisagée. Ce problème fera l'objet du présent travail.

Notons tout d'abord, qu'environ 50% des sucres du

moût sont fermentés en absence de multiplication cellulaire. Il en résulte que les fluctuations du pouvoir fermentaire sont essentiellement liées aux variations cycliques de l'état physiologiques des cellules de levure.

Le fait que la croissance est caractérisée par un équilibre fonctionnel entre les processus de biosynthèse et de dégradation, nous conduit à admettre l'existence d'un nouvel état d'équilibre si l'on change un des paramètres du système.

En conclusion, nous pouvons considérer la diminution de la vitesse de fermentation, en absence de multiplication cellulaire, comme la conséquence du ralentissement des réactions biosynthétiques liées à la croissance.

I. - VARIATIONS DU METABOLISME FERMENTAIRE AU COURS DU CYCLE DE LA CROISSANCE EN ANAEROBIOSE

Dans le but de vérifier les observations de HARRIS et MILLIN, une série de croissances ont été effectuées dans des conditions où la multiplication cellulaire est limitée par la teneur en azote du milieu de culture.

Les essais ont été effectués avec une levure haute (*S.cerevisiae* n° 106) cultivée en anaérobiose (culture non agitée) sur milieu complet (voir techniques) contenant 10% de glucose et respectivement 0,1. 0,3 et 2,5% d'extrait de levures. (Difco)

Chaque culture estensemencée à une d.o. de 0,100 à l'aide d'une préculture de 5 jours sur le même milieu.

Le pouvoir fermentaire ($Q_{CO_2}^N$ glucose) est déterminé tout au long du cycle de la croissance jusqu'à épuisement complet du glucose du milieu.

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant et ont été calculés après 60 minutes d'incubation à 30°C dans un tampon phosphate M/15 à pH 4,5 contenant 4% de glucose.

Tableau 25.

Evolution du pouvoir fermentaire au cours du cycle de la croissance.

extrait de levures en gr./ L.	temps de croissance en jours					
	0	1	2	3	4	5
1	169	271	168	112	111	103
3	127	323	255	208	149	148
25	220	328	400	350	305	230

La figure 18 représente les courbes de croissance en anaérobiose pour différentes concentrations en extrait de levure. Le palier indiquant la croissance maximum dépend de la concentration en azote du milieu. Chaque phase de la croissance se caractérise par des variations parallèles du métabolisme fermentaire.

Déjà la phase de latence coïncide avec une augmentation sensible de la vitesse de dégradation anaérobie du glucose. Celle-ci se poursuit pendant une fraction du cycle et le pouvoir fermentaire maximum est obtenu à la fin de la phase exponentielle de croissance. Nous observons ensuite une diminution de la capacité fermentaire pour atteindre son niveau minimum au cours de la phase stationnaire.

Les niveaux maximum et minimum sont également fonction du rapport azote-sucre du milieu.

II. - VARIATIONS DU METABOLISME FERMENTAIRE AU COURS DE LA PHASE DE LATENCE.

Afin de préciser le phénomène nous avons étudié l'influence de la composition azotée du milieu sur l'évolution de la vitesse de fermentation au cours de la phase de latence.

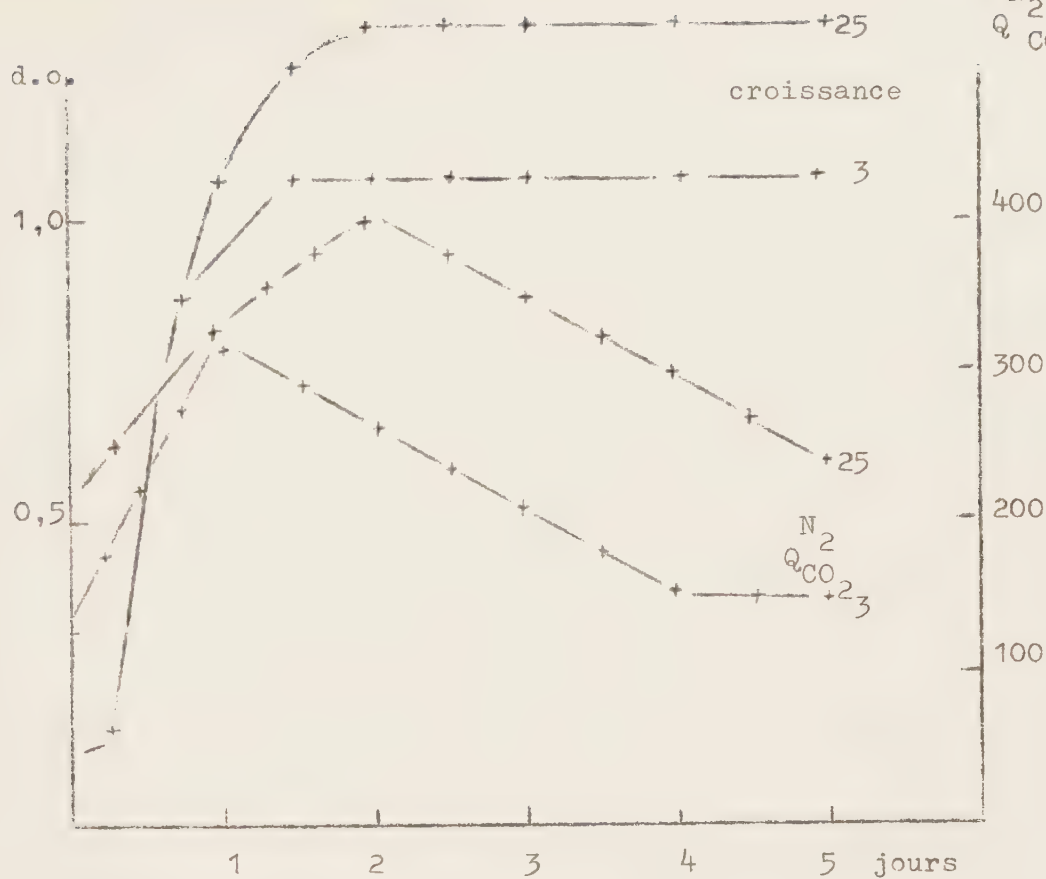
N_2
 Q_{CO_2}


Figure 18.: Evolution du pouvoir fermentaire au cours du cycle de la croissance en anaérobiose.

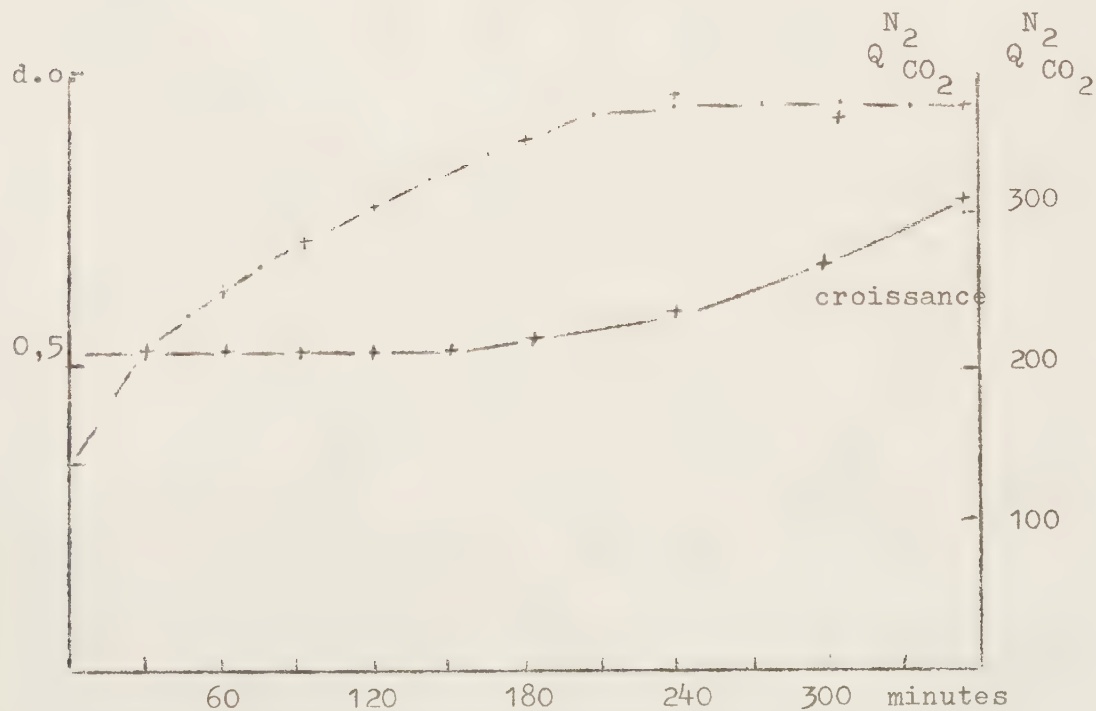


Figure 19.: Evolution du pouvoir fermentaire au cours de la phase de latence.

Les essais ont été effectués avec une levure récoltée en fin de fermentation, (phase stationnaire tardive $Q_{CO_2}^{N_2}$ minimum) sur un milieu contenant 10% de glucose et 0,3% d'extrait de levures. Les cellules sont ensuite lavées stérilement à l'eau physiologique puis ensemencées dans le même milieu à une d.o. de 0,500. Les pouvoirs fermentaires sont calculés après 60 minutes d'incubation en Warburg en effectuant des prélèvements toutes les 30 minutes. Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 26.

Evolution du pouvoir fermentaire au cours de la phase de latence.

	temps de croissance en minutes								
	0	30	60	90	120	180	240	300	360
D.O.	0,520	0,520	0,520	0,520	0,520	0,540	0,590	0,670	0,750
$Q_{CO_2}^{N_2}$	140	211	247	277	297	350	374	361	364

Nous remarquons une augmentation de la d.o. après 3 heures d'incubation dans le milieu. A ce moment la majeure partie des cellules bourgeonnent. (Figure 19)

Il nous semble extrêmement intéressant de noter que la vitesse de fermentation a pratiquement atteint son niveau maximum à la fin de la phase de latence. Dès que la phase exponentielle de croissance s'amorce (4 heures) les cellules entrent dans un état d'équilibre qui se caractérise par une vitesse constante.

Comme toute variation du métabolisme fermentaire doit nécessairement se refléter dans la constitution enzymatique de la cellule, nous pouvons admettre que la phase de latence correspond soit à la synthèse soit à la désinhibi-

tion d'un ou de plusieurs enzymes intervenant dans la dégradation anaérobie du glucose.

Nous savons d'autre part que la levure contient une réserve intracellulaire d'acides aminés et de nucléotides et que ces constituants jouent un rôle essentiel dans la biosynthèse des protéines. SPIEGELMAN et HALVORSON (138) ont montré que cette réserve dépend quantitativement de la composition du milieu.

Partant de ce principe, nous avons effectué des incubations en variant la composition azotée. Différents milieux ont été utilisés:

- a) milieu minéral (voir Techniques)
- b) milieu minéral (contenant 0,5% d'un hydrolysate de caséine. (Difco)
- c) tampon phosphate glucosé contenant 0,5% d'extrait de levures.
- d) tampon phosphate glucosé contenant 0,5% d'un hydrolysate de caséine.

Les pouvoirs fermentaires sont calculés après 60 minutes d'incubation en Warburg en effectuant des prélèvements toutes les 30 minutes.

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 27.

Influence de la composition du milieu sur l'évolution du pouvoir fermentaire au cours de la phase de latence.

	temps de croissance en minutes						
milieu	0	30	60	120	180	240	300
a	130	165	180	228	276	280	282
b	145	176	185	231	307	289	298
c	175	217	249	283	294	386	395
d	214	261	272	314	306	278	303

Notons tout d'abord qu'indépendamment de la composition du milieu, la vitesse maximum est obtenue après 180 à 240 minutes d'incubation ce qui confirme les résultats obtenus dans le cas d'un milieu complet.

Seul le milieu contenant 0,5% d'extrait de levures donne un maximum plus élevé.

La figure montre une fois de plus le parallélisme frappant qui existe entre l'évolution de l'état physiologique des cellules et celle du métabolisme fermentaire.

III. - VARIATIONS DU METABOLISME FERMENTAIRE AU COURS DE LA CROISSANCE ANAEROBIE EN PRESENCE D'ACTIDIONE

La dégradation des acides nucléiques et protéines est généralement stimulée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ou en imposant à la cellule des conditions qui ne permettent pas une croissance équilibrée. (51) MANDELSTAM (101) a montré que le chloramphénicol qui bloque la synthèse protéique chez E.coli n'influence pas la vitesse de dégradation des protéines.

Chez la levure la synthèse de l'ADN et des protéines est fortement inhibée en présence d'actidione. Cet antibiotique présente l'avantage de pouvoir être éliminé par simple lavage à l'eau.

Par conséquent l'ajoute d'actidione à un milieu de culture devrait arrêter la synthèse de nouvelles protéines sans toutefois affecter l'activité des enzymes hydrolytiques.

En admettant une dégradation possible d'un ou de plusieurs enzymes de la glycolyse, il faudrait normalement s'attendre à une diminution de la vitesse de fermentation en présence d'actidione.

Des essais ont donc été réalisés en ajoutant de l'actidione à une concentration de 2 p.p.m. au cours du cycle de la croissance.

Les croissances ont été effectuées en anaérobiose (barbotage de CO_2) sur milieu complet contenant 10% de glucose et 0,3% d'extrait de levures. Chaque culture est ensemencée à l'aide d'une préculture de 5 jours sur le même milieu. L'actidione est ensuite ajouté aux d.o. suivantes:

- 1): 0,085 : fin phase de latence
- 2): 0,140 : début phase exponentielle de croissance
- 3): 0,215 : début phase exponentielle de croissance
- 4): 0,560 : milieu phase exponentielle de croissance
- 5): 1,20 : fin phase exponentielle de croissance
- 6): 1,25 : début phase stationnaire
- 7): 1,25 : phase stationnaire tardive

Les cellules sont récoltées après différents temps d'incubation en présence d'actidione, lavées et remises en suspension dans un tampon phosphate M/15 à pH 4,5. Les pouvoirs fermentaires sont calculés après 60 minutes d'incubation en Warburg. Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 28.

Evolution du pouvoir fermentaire ($Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$) au cours de la croissance anaérobie en présence d'actidione.

Acti- dione ajouté	temps d'incubation en présence d'actidione en heures						
	0	1	2	3	4	6	17
1	334	250	246	-	-	-	-
2	433	-	221	-	152	137	-
3	442	-	323	-	283	-	-
4	480	-	-	-	-	221	173
5	473	-	-	-	-	327	244
6	221	-	-	-	190	183	-
7	182	203	189	201	192	191	-

L'accroissement de la masse cellulaire en présence d'actidione est faible même pour des cellules récoltées pendant la phase exponentielle de croissance. En moyenne nous avons obtenu une augmentation de 10 à 15% après 2 heures. Celle-ci pourrait être attribuée à la formation de matériaux de réserve (polysaccharides et lipides) dont la synthèse est indépendante de celle des protéines. (8,42,76)

Il faudrait donc normalement s'attendre à une dilution des enzymes glycolytiques par conséquent à une diminution de la vitesse de fermentation qui serait proportionnelle à l'accroissement de la masse cellulaire. Or, la capacité fermentaire diminue de moitié après 2 heures d'incubation en présence d'actidione à la fin de la phase de latence ou au début de la phase de croissance. Cette sensibilité des enzymes de la fermentation alcoolique diminue au fur et à mesure que la croissance progresse. Au cours de la phase stationnaire l'actidione s'avère sans effet sur le métabolisme fermentaire.

Si ces résultats sont en faveur d'un mécanisme régulateur basé sur une activation des protéinases liées aux ribosomes, ils ne permettent toutefois pas d'exclure une inhibition éventuelle de certains enzymes de la glycolyse par une accumulation de métabolites (ATP) due à un arrêt ou à un ralentissement des processus biosynthétiques.

IV. - VARIATIONS DU METABOLISME FERMENTAIRE EN ABSENCE D'UNE SOURCE D'AZOTE

Jusqu'à présent nous nous sommes limités à définir les conditions qui déterminent les variations du métabolisme fermentaire au cours du cycle de la croissance en anaérobiose.

D'une manière générale les variations sont cycliques: chaque période de croissance entraînant une stabilisation du pouvoir fermentaire à une vitesse maximum; chaque période de fermentation en absence de multiplication cellu-

laire une diminution de l'efficacité par cellule.

Comme la phase stationnaire peut être considérée comme une incubation de la levure en absence d'une source d'azote, nous avons étudié les différents paramètres métaboliques qui pourraient intervenir dans la stabilité du pouvoir fermentaire notamment: les conditions préalables de croissance, la durée de l'incubation et l'aération.

Les essais ont été effectués à l'aide de deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* (une levure haute: n° 106) et une levure de boulangerie (Yeast Foam) et d'une souche de *Saccharomyces Carlsbergensis*. (levure basse) Les levures sont cultivées soit en aérobiose (fioles cylindroconiques remplies au 1/3 du volume et agitées avec une fréquence de 75 oscillations/min) soit en anaérobiose. (fioles cylindroconiques remplies au 9/10 du volume et non agitées)

Les cellules sont récoltées pendant la phase exponentielle de croissance, lavées à l'eau distillée froide et finalement mises en suspension soit dans un tampon phosphate KH_2PO_4 M/15 à pH 4,5, soit dans le même tampon glucosé à 2%. L'opacité des suspensions exprimée en densité optique pour une épaisseur de 1 cm. a été fixée à 0,600.

Les suspensions sont agitées à 30°C. L'anaérobiose est réalisée par un barbotage d'azote.

L'intensité relative du pouvoir fermentaire a été définie comme étant le rapport du $Q_{\text{N}_2}^2$ des levures après incubation au $Q_{\text{CO}_2}^2$ des levures non incubées.

A. *Saccharomyces cerevisiae* (Yeast Foam)

1) croissance aérobie:

a) tampon glucosé

Après croissance les levures sont mises en suspension dans un tampon KH_2PO_4 M/15 contenant 2% de glucose. Le pouvoir fermentaire est déterminé en fonction de la

durée d'incubation dans le tampon. Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

C'est le pouvoir fermentaire des levures récoltées immédiatement après croissance qui représente le terme de comparaison que nous adoptons comme référence.

Tableau 29.

Influence de la durée et des conditions d'incubation dans le tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{M}/15$ contenant 2% de glucose en absence de multiplication cellulaire sur la stabilité du pouvoir fermentaire de *S. cerevisiae* (yeast foam) après croissance aérobie

temps d'incubation dans le tampon en heure	aérobie		anaérobie	
	N_2 Q_{CO_2}	intensité relative	N_2 Q_{CO_2}	intensité relative
0	310	1,0	310	1,0
1	310	1,0	310	1,0
3	192	0,62	220	0,71
5	175	0,56	205	0,66
7	160	0,51	195	0,63
16	145	0,46	180	0,58

Il ressort des résultats du tableau 29 qu'une incubation dans un tampon phosphate glucosé réduit considérablement la capacité fermentaire de *S. Cerevisiae*.

Le N_2 Q_{CO_2} reste stable pendant 60 minutes; après 3 heures nous constatons une diminution du pouvoir fermentaire de 40% après incubation aérobie et de 30% après incubation anaérobie, ce qui fait apparaître l'effet protecteur de l'anaérobiose.

Une prolongation du temps d'incubation de 3 à 16 heures provoque un fléchissement de la courbe. Après 7

heures d'incubation aérobie et anaérobie, nous obtenons respectivement 0,51 et 0,63 comme valeur de l'intensité relative du pouvoir fermentaire.

b) tampon non glucosé

Après croissance les levures sont mises en suspension dans un tampon KH_2PO_4 M/15. Le pouvoir fermentaire est déterminé après 7 heures d'incubation à 30°C. en aérobiose et en anaérobiose. Les mesures manométriques sont effectuées toutes les 10 minutes et le pouvoir fermentaire est calculé en fonction du temps d'agitation dans l'appareil de Warburg. Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 30.

Adaptation à la fermentation du glucose de *S.cerevisiae* (yeast foam) après 7 heures d'incubation dans un tampon KH_2PO_4 M/15.

Temps d'incubation au Warburg en minutes	N_2 Q CO_2	aérobie	anaérobie	
		intensité relative	N_2 Q CO_2	intensité relative
10	215	0,69	265	0,85
20	252	0,81	300	0,97
30	276	0,89	304	0,98
40	300	0,97	306	0,98
50	304	0,98	304	0,98
60	302	0,97	303	0,98

Les résultats du tableau 30 montrent une adaptation à la fermentation du glucose après incubation dans le tampon phosphate non glucosé. En effet après 7 heures

d'incubation aérobie en absence de glucose, la vitesse maximum de fermentation dépend du temps d'incubation dans l'appareil de Warburg en présence du substrat. Après 10 minutes, nous obtenons une intensité relative de 0,69 et la vitesse maximum n'est atteinte qu'après 40 minutes avec un pouvoir fermentaire sensiblement égal à celui des levures non incubées.

Si nous effectuons la même expérience avec des levures incubées dans le tampon phosphate glucosé, nous constatons que l'évolution du pouvoir fermentaire est nettement différent.

2) croissance anaérobie:

a) tampon glucosé

Les conditions expérimentales sont celles utilisées précédemment. Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 31.

Influence de la durée et des conditions d'incubation dans le tampon KH_2PO_4 M/15 contenant 2% de glucose en absence de multiplication cellulaire sur la stabilité de pouvoir fermentaire de *S. cerevisiae* (yeast foam) après croissance anaérobie.

temps d'incubation dans le tampon en heures	aérobie		anaérobie	
	N_2 Q_{CO_2}	intensité relative	N_2 Q_{CO_2}	intensité relative
0	450	1,0	450	1,0
1	450	1,0	450	1,0
3	279	0,62	306	0,68
5	202	0,45	230	0,51
7	171	0,38	193	0,43
16	148	0,33	175	0,39

Il ressort de la comparaison des tableaux 29 et 31 que les conclusions obtenues après croissance anaérobie sont semblables à celles obtenues après croissance en aérobiose. Nous remarquons toutefois quelques différences quantitatives que nous discuterons ci-après. Tout d'abord le $Q_{CO_2}^{N_2}$ des levures non incubées après croissance aérobie est nettement plus faible (310) par rapport au $Q_{CO_2}^{N_2}$ après croissance anaérobie. (450)

D'autre part, la perte du pouvoir fermentaire est plus grande après croissance anaérobie. Après 7 heures d'incubation aérobie dans le tampon phosphate glucosé nous obtenons une intensité relative du $Q_{CO_2}^{N_2}$ de 0,38, alors qu'après le même temps d'incubation nous obtenions une valeur de 0,51 après croissance aérobie. Nous constatons également un effet protecteur lorsque l'incubation se fait en anaérobiose.

b) tampon non glucosé:

Les conditions expérimentales sont celles utilisées précédemment. Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 32.

Adaptation à la fermentation du glucose de *S.cerevisiae* (yeast foam) après 7 heures d'incubation dans un tampon KH_2PO_4 M/15.

temps d'incubation au Warburg en minutes	aérobie		anaérobie	
	$Q_{CO_2}^{N_2}$	intensité relative	$Q_{CO_2}^{N_2}$	intensité relative
10	110	0,24	110	0,24
20	146	0,32	150	0,33
30	232	0,54	250	0,56
40	320	0,7	340	0,76
50	350	0,78	370	0,82
60	350	0,78	370	0,82

Les résultats du tableau 32 confirment ceux obtenus après croissance aérobie. Nous remarquons une perte transitoire du pouvoir fermentaire après 7 heures d'incubation dans le tampon non glucosé. La vitesse maximum de fermentation s'obtient 50 minutes après l'addition du glucose dans la fiole de Warburg et représente à ce moment 80% du pouvoir fermentaire des levures témoin. Par contre après 7 heures d'incubation dans le tampon phosphate glucosé cette vitesse est atteinte après 10 minutes avec une intensité relative du $Q \frac{N_2}{CO_2}$ de 0,38.

B. Saccharomyces cerevisiae. (levure haute)

1) croissance aérobie

Toutes les conditions expérimentales sont celles utilisées dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae*. (yeast foam)

a) tampon glucosé:

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant

Tableau 33 - Figure 20

Influence de la durée et des conditions d'incubation dans le tampon KH_2PO_4 M/15 contenant 2% de glucose en absence de multiplication cellulaire sur la stabilité du pouvoir fermentaire de *S. cerevisiae* (levure haute) après croissance aérobie.

temps d'incubation dans le tampon en heures	aérobie		anaérobie	
	$Q \frac{N_2}{CO_2}$	intensité relative	$Q \frac{N_2}{CO_2}$	intensité relative
0	310	1,0	310	1,0
1	305	0,98	308	0,99
3	186	0,6	192	0,62
5	139	0,45	146	0,47
7	114	0,37	115	0,37
16	51	0,16	101	0,32

La comparaison des résultats des tableaux 29 et 31 ne révèle aucune différence entre le pouvoir fermentaire de *S. cerevisiae* (yeast foam) et de *S. cerevisiae* (levure haute) pour autant que ces deux levures soient récoltées dans des conditions physiologiques semblables.

Nous constatons cependant des différences quantitatives au point de vue de la perte de leur pouvoir fermentaire.

Après 7 heures d'incubation dans le tampon phosphate glucosé la capacité fermentaire de la levure haute ne représente plus que 37% de celle des levures non incubées, alors que dans ces mêmes conditions l'intensité relative du $Q_{CO_2}^{N_2}$ de la levure yeast foam était de 0,51. D'autre part, l'influence de l'anaérobiose ne se manifeste plus qu'après 16 heures d'incubation.

b) tampon non glucosé

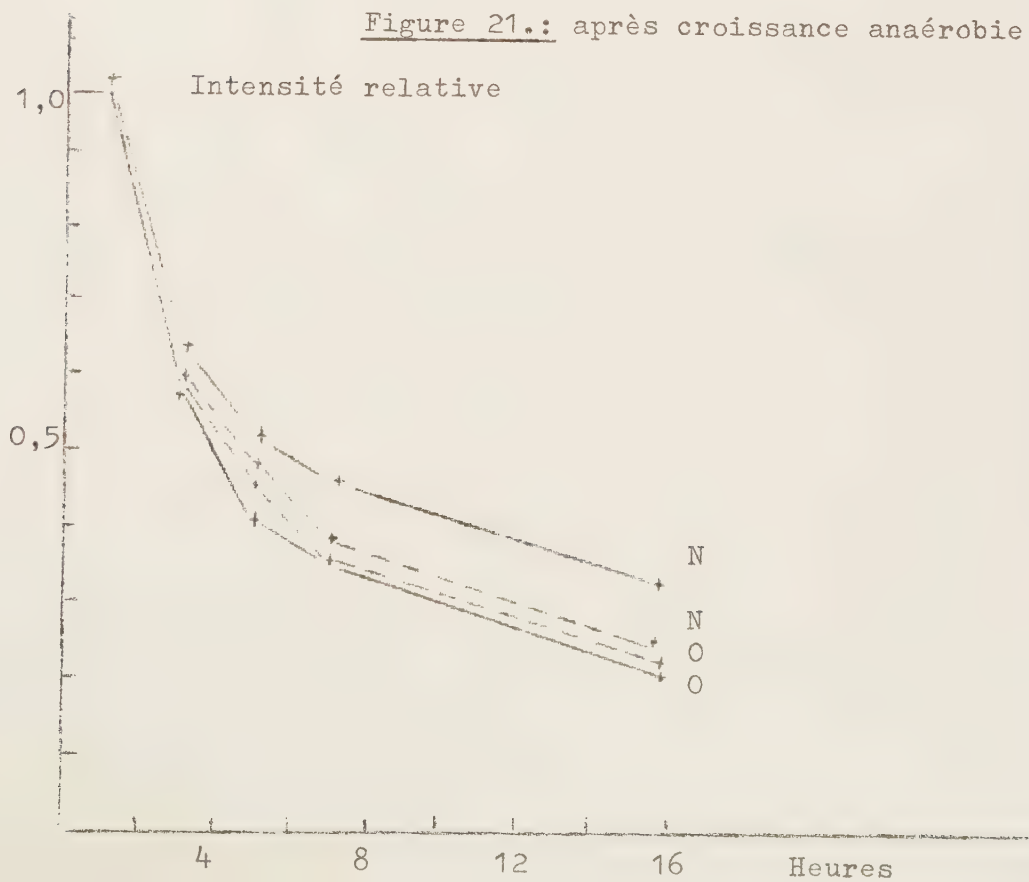
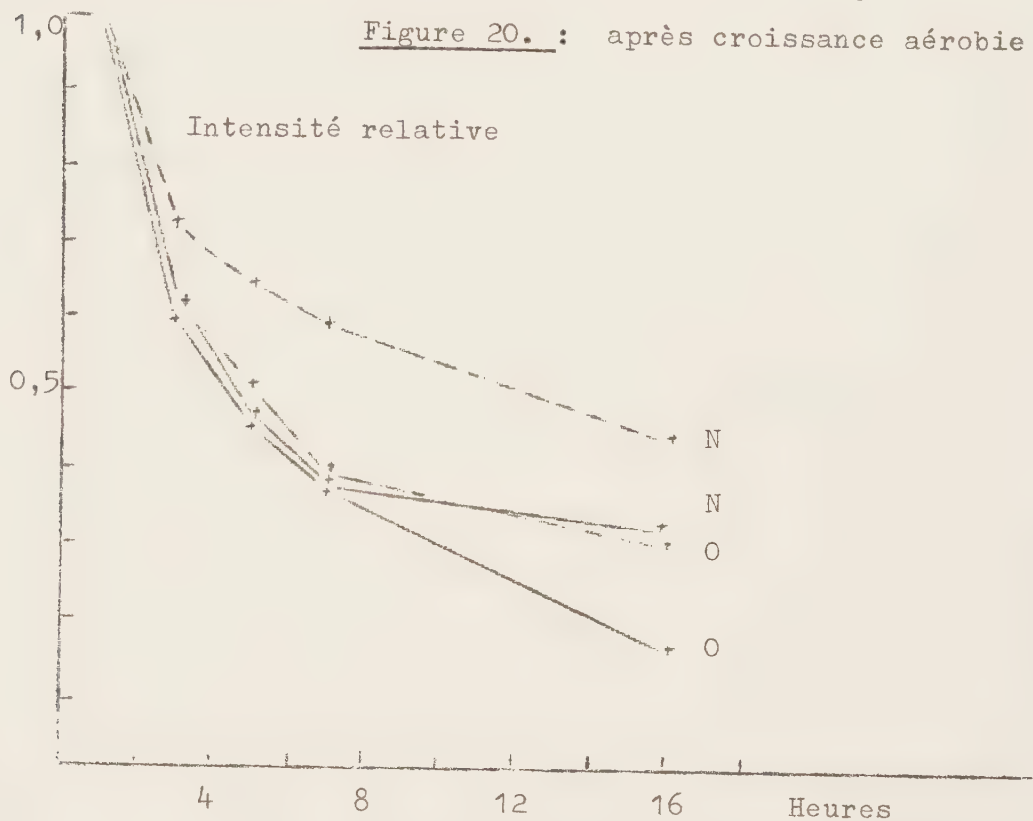
Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 34.

Adaptation à la fermentation du glucose de *S. Cerevisiae* (levure haute) après 7 heures d'incubation dans un tampon KH_2PO_4 M/15.

Temps d'incubation au Warburg en minutes	aérobie		anaérobie	
	$Q_{CO_2}^{N_2}$	intensité relative	$Q_{CO_2}^{N_2}$	intensité relative
10	49	0,16	109	0,35
20	98	0,31	212	0,68
30	174	0,56	300	0,97
40	260	0,84	301	0,97
50	309	1,0	300	0,97
60	309	1,0	299	0,97

Evolution du pouvoir fermentaire après incubation aérobie (O) et anaérobie (N) dans un tampon glucosé d'une levure haute + ——— + et d'une levure basse + ---- +:



La comparaison des tableaux 29 et 34 montre une adaptation à la fermentation du glucose pour les deux levures quoique le phénomène est nettement plus accentué dans le cas de la levure haute. En effet, après 7 heures d'incubation dans le tampon non glucosé l'intensité relative du $Q \frac{N_2}{CO_2}$ est retombée à 0,16 après 10 minutes d'incubation en présence du substrat contre une valeur de 0,69 pour la levure yeast foam. Nous remarquons également que l'incubation anaérobie diminue proportionnellement la perte réversible du pouvoir fermentaire.

2) croissance anaérobie:

a) tampon glucosé:

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 35 - Figure 21

Influence de la durée et des conditions d'incubation dans le tampon KH_2PO_4 M/15 contenant 2% de glucose en absence de multiplication cellulaire sur la stabilité du pouvoir fermentaire de *S.Cerevisiae* (levure haute) après croissance anaérobie.

temps d'incubation dans le tampon en heures	aérobie		anaérobie	
	$Q \frac{N_2}{CO_2}$	intensité relative	$Q \frac{N_2}{CO_2}$	intensité relative
0	422	1,0	422	1,0
1	420	0,99	419	0,99
3	335	0,58	270	0,64
5	173	0,41	219	0,52
7	150	0,35	195	0,46
16	90	0,21	142	0,33

Les résultats obtenus après croissance anaérobie, tableau 35 (figure 1) confirment ceux obtenus dans le cas de la levure yeast foam._N² (tableau 31) Nous notons une augmentation de 30% du $Q_{CO_2}^2$ après croissance anaérobie. Il faut toutefois signaler² que par rapport à la levure de boulangerie la perte du pouvoir fermentaire de la levure haute est légèrement plus élevée après croissance anaérobie, quoique la différence ne se manifeste qu'après 16 heures d'incubation aérobie dans le tampon glucosé.

b) tampon non glucosé:

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant

Tableau 36.

Adaptation à la fermentation du glucose de *S.Cerevisiae* (levure haute) après 7 heures d'incubation dans un tampon KH_2PO_4 M/15.

temps d'incubation au Warburg en minutes	aérobie		anaérobie	
	N_2 Q_{CO_2}	Intensité relative	N_2 Q_{CO_2}	Intensité relative
10	273	0,64	268	0,63
20	341	0,79	357	0,85
30	403	0,95	370	0,89
40	402	0,95	368	0,89
50	405	0,96	372	0,89
60	401	0,95	370	0,89

Les conclusions sont les mêmes que celles obtenues précédemment. (tableau 32).

L'incubation dans le tampon non glucosé provoque une perte transitoire du pouvoir fermentaire. Le temps nécessaire pour atteindre la vitesse maximum de fermentation semble dépendre des conditions de croissance et des conditions d'incubation.

C. Saccharomyces Carlsbergensis. (levure basse)

1) croissance aérobie:

Les conditions expérimentales sont celles utilisées pour les autres levures.

a) tampon glucosé:

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 37. - Figure 20

Influence de la durée et des conditions d'incubation dans le tampon KH_2PO_4 M/15 contenant 2% de glucose en absence de multiplication cellulaire sur la stabilité du pouvoir fermentaire de *S. Carlsbergensis* (levure basse) après croissance aérobie.

temps d'incubation dans le tampon en heures	aérobie		anaérobie	
	N_2 Q CO_2	intensité relative	N_2 Q CO_2	intensité relative
0	279	1,0	279	1,0
1	274	0,99	275	0,99
3	170	0,61	201	0,72
5	140	0,5	181	0,65
7	109	0,39	167	0,59
16	89	0,31	123	0,44

La cinétique de la perte du pouvoir fermentaire de *S. carlsbergensis* après incubation dans le tampon glucosé est semblable à celle observée chez la levure haute et la levure de boulangerie. Nous remarquons toutefois un effet protecteur plus marqué de l'anaérobiose.

b) tampon non glucosé:

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 38.

Adaptation à la fermentation du glucose de *S. Carlsbergensis* (levure basse) après 7 heures d'incubation dans un tampon KH_2PO_4 M/15

temps d'incubation au Warburg en minutes	aérobie		anaérobie	
	N_2 Q_{CO_2}	Intensité relative	N_2 Q_{CO_2}	Intensité relative
10	68	0,24	99	0,35
20	142	0,50	215	0,76
30	224	0,80	240	0,85
40	258	0,9	253	0,90
50	259	0,91	255	0,91
60	259	0,91	255	0,91

Il ressort des résultats du tableau 38 qu'une incubation aérobie ou anaérobie de *S. carlsbergensis* dans un tampon phosphate non glucosé provoque une perte réversible du pouvoir fermentaire. La vitesse maximum de fermentation n'est obtenue qu'après 40 minutes d'incubation en présence du glucose.

2) croissance anaérobie:

a) tampon glucosé:

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 39. - Figure 21

Influence de la durée et des conditions d'incubation dans le tampon KH_2PO_4 M/15 contenant 2% de glucose en absence de multiplication cellulaire sur la stabilité du pouvoir fermentaire de *S. carlsbergensis* (levure basse) après croissance anaérobie.

temps d'incubation dans le tampon en heures	aérobie		anaérobie	
	N_2 Q CO_2	Intensité relative	N_2 Q CO_2	Intensité relative
0	450	1,0	450	1,0
1	445	0,99	448	0,99
3	261	0,58	270	0,6
5	207	0,46	202	0,47
7	159	0,35	170	0,38
16	105	0,23	109	0,24

Nous remarquons une analogie parfaite entre les résultats des tableaux 31, 35 et 39 (figure 21). L'évolution de la perte de la capacité fermentaire des trois levures étudiées suit la même courbe et les valeurs des intensités relatives du Q CO_2 sont comparables en fonction des différents temps d'incubation dans le tampon glucosé. Nous ne constatons toutefois aucune protection de l'anaérobiose dans le cas de *S. carlsbergensis*. Nous tenons également à signaler que la croissance anaérobie augmente le pouvoir fermentaire de 40% par rapport à la croissance aérobie.

b) tampon non glucosé:

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 40.

Adaptation à la fermentation du glucose de *S. Carlsbergensis* (levure basse) après 7 heures d'incubation dans un tampon KH_2PO_4 M/15

temps d'incubation au Warburg en minutes	aérobie		anaérobie	
	N_2 Q_{CO_2}	Intensité relative	N_2 Q_{CO_2}	Intensité relative
10	389	0,85	360	0,8
20	393	0,87	365	0,81
30	392	0,87	366	0,81
40	394	0,87	366	0,81
50	393	0,87	364	0,81
60	393	0,87	366	0,81

L'incubation de *S. carlsbergensis* (levure basse) dans le tampon non glucosé ne diminue que de 15 à 20% la capacité fermentaire de cette levure.

La comparaison des tableaux 32, 36 et 39 montre une adaptation à la fermentation du glucose après croissance aérobie alors qu'après croissance anaérobie la vitesse maximum de fermentation est déjà atteinte après 10 minutes d'incubation en présence du substrat.

V. INFLUENCE DES ACIDES AMINES SUR LA REVERSIBILITE DE LA PERTE DE LA CAPACITE FERMENTAIRE.

SPIEGELMAN, HALVORSON et BEN ISHAI (138) ont montré que la levure possède une réserve intracellulaire d'acides aminés. Ces auteurs signalent également que cette réserve peut être rapidement épuisée lors d'une incubation aérobie de la levure en présence de glucose. Une inanition des levures en absence de ce substrat ne permet pas l'utilisation

de cette réserve d'acides aminés. Nous remarquons immédiatement le rapprochement entre les conditions expérimentales de SPIEGELMAN et COLL. et celles utilisées pour induire la perte du pouvoir fermentaire sur glucose.

Il semble donc tentant d'attribuer la diminution de la capacité fermentaire de la levure à l'épuisement de sa réserve d'acides aminés.

HALVORSON (55) et ROINE (127) ont montré qu'il est possible de reconstituer cette réserve d'azote aminé libre en incubant la levure pendant 15 minutes dans un tampon phosphate glucosé contenant 0,5% d'un hydrolysate de caséine. Ceci nous a amené à vérifier si ce traitement permettait le rétablissement de la capacité fermentaire de la levure haute.

a) Influence de la recharge de la réserve d'acides aminés libres sur le rétablissement du pouvoir fermentaire:

L'expérience est conduite comme suit: après croissance aérobie les levures sont incubées pendant 7 heures dans un tampon phosphate glucosé, et sont ensuite, après centrifugation, mises en suspension soit dans du moût, soit dans de la bière ou encore dans un tampon phosphate glucosé contenant 0,5% d'un hydrolysate de caséine. Le pouvoir fermentaire est déterminé par mesure manométrique après 30 minutes d'incubation à 30°C en aérobiose. Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 41.

Influence d'un hydrolysate de caséine, du moût et de la bière sur le rétablissement du pouvoir fermentaire de *S. cerevisiae* (levure haute) après incubation dans un tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{M}/15$ contenant 2% de glucose.

N_2 Q CO_2	témoin levures non incubées	tampon glucosé	bière	moût	tampon glucosé+hydrolysate de caséine
	320	134	148	256	269

intensité relative N ² du Q _{CO₂}	1,0	0,42	0,46	0,80	0,84
--	-----	------	------	------	------

Les résultats du tableau 41 montrent que le moût et l'hydrolysat de caséine rétablissent le pouvoir fermentaire après 30 minutes d'incubation. Dans ces mêmes conditions la bière s'avère sans effet.

Cette expérience montre que la perte du pouvoir fermentaire est réversible et que la perte et le rétablissement du $Q_{CO_2}^{N^2}$ dépendent essentiellement de la composition de la réserve intracellulaire d'acides aminés. Les résultats négatifs obtenus avec la bière prouvent que celle-ci ne contient pas suffisamment d'azote aminé libre pour reconstituer cette réserve et permettre l'adaptation.

b) Influence de l'irradiation dans l'ultraviolet sur l'adaptation à la fermentation du glucose:

SWENSON et GIESE (149) ont montré que la synthèse protéique peut être arrêté par irradiation dans l'ultraviolet. Nous avons utilisé cette technique pour démontrer que la réadaptation à la fermentation du glucose dépend d'une néosynthèse de protéines via la réserve intracellulaire d'acides aminés. Nous décrirons ici brièvement l'expérience faite: Les cellules sont récoltées par centrifugation en phase de croissance exponentielle en aérobiose; elles sont lavées puis mises en suspension soit dans le tampon phosphate soit dans le tampon phosphate contenant 2% de glucose. Après 7 heures d'incubation, les cellules sont centrifugées et lavées. Une partie aliquot de chacune des deux suspensions est irradiée pendant 3 minutes dans l'ultraviolet. A cet effet la suspension de levures est introduite dans une boîte de Pétri ouverte (épaisseur de la couche 0,2 cm.) et disposée à une distance de 15cm. d'une lampe germicide ACEC(ateliers de construction de Charleroi) de 15 Watt.

Seules les cellules incubées dans le tampon glucosé sont ensuite traitées pendant 30 minutes en présence de 0,5% d'hydrolysât de caséine. Nous déterminerons ensuite le pouvoir fermentaire des cellules irradiées et non irradiées. Les résultats obtenus sont exprimés dans les tableaux suivants.

Tableau 42.

Influence de l'irradiation dans l'ultraviolet sur l'adaptation à la fermentation du glucose de *S. cerevisiae* après incubation dans le tampon KH_2PO_4 M/15 contenant 2% de glucose.

	témoin	tampon glucosé	tampon glucosé+hydrolysât de α -séine non irradié	tampon glucosé+hydrolysât de caséine après irradiation
$\frac{\text{N}_2}{\text{Q CO}_2}$	290	140	250	135
intensité relative du $\frac{\text{N}_2}{\text{Q CO}_2}$	1,0	0,48	0,86	0,47

Tableau 43.

Influence de l'irradiation dans l'ultraviolet sur la cinétique d'adaptation à la fermentation du glucose après incubation dans le tampon phosphate non glucosé.

temps d'incubation au Warburg en minutes en présence de 4% de glucose	témoin N_2 Q_{CO_2}	tampon non glucosé et non irradié	tampon non glucosé et irradié
10	285	171	169
20	288	255	169
30	287	260	168
40	289	264	169
50	290	265	170
60	289	265	168

Les résultats du tableau 42 montrent qu'une incubation en présence d'un hydrolysât de caséine rétablit le potentiel fermentaire des cellules non irradiées après 7 heures d'incubation dans un tampon glucosé à 2% ce qui confirme les résultats du tableau.

Par contre, après irradiation de la suspension de levures, traitée de la même façon, l'hydrolysât de caséine n'est plus capable d'augmenter la vitesse de dégagement du CO_2 . En effet, après incubation en présence d'un mélange d'acides aminés l'intensité relative du $Q_{CO_2}^{N_2}$ s'élève à 0,86 alors qu'après irradiation de l'échantillon la valeur demeure faible et identique à celle obtenue pour le tampon glucosé soit 0,47.

Nous avons vu que dans le cas de l'incubation dans le tampon phosphate non glucosé, la chute initiale du pouvoir fermentaire sur glucose est suivie d'une adaptation en présence du substrat avec rétablissement de la vitesse maximum de fermentation après 30 à 50 minutes.

Le tableau 43 montre qu'après irradiation dans l'ultraviolet, la vitesse maximum de fermentation est stabilisée à sa valeur initiale alors que les cellules non irradiées s'adaptent normalement à la fermentation du glucose.

La figure 22 montre la cinétique d'adaptation à la fermentation du glucose après 7 heures d'incubation dans le tampon non glucosé. Le $Q_{CO_2}^{N_2}$ des cellules non irradiées s'élève à 264 après 40 minutes d'incubation au Warburg en présence de 4% de glucose. Après irradiation le pouvoir fermentaire est atteint après 10 minutes avec une valeur semblable à celle des cellules non irradiées avant adaptation soit 169.

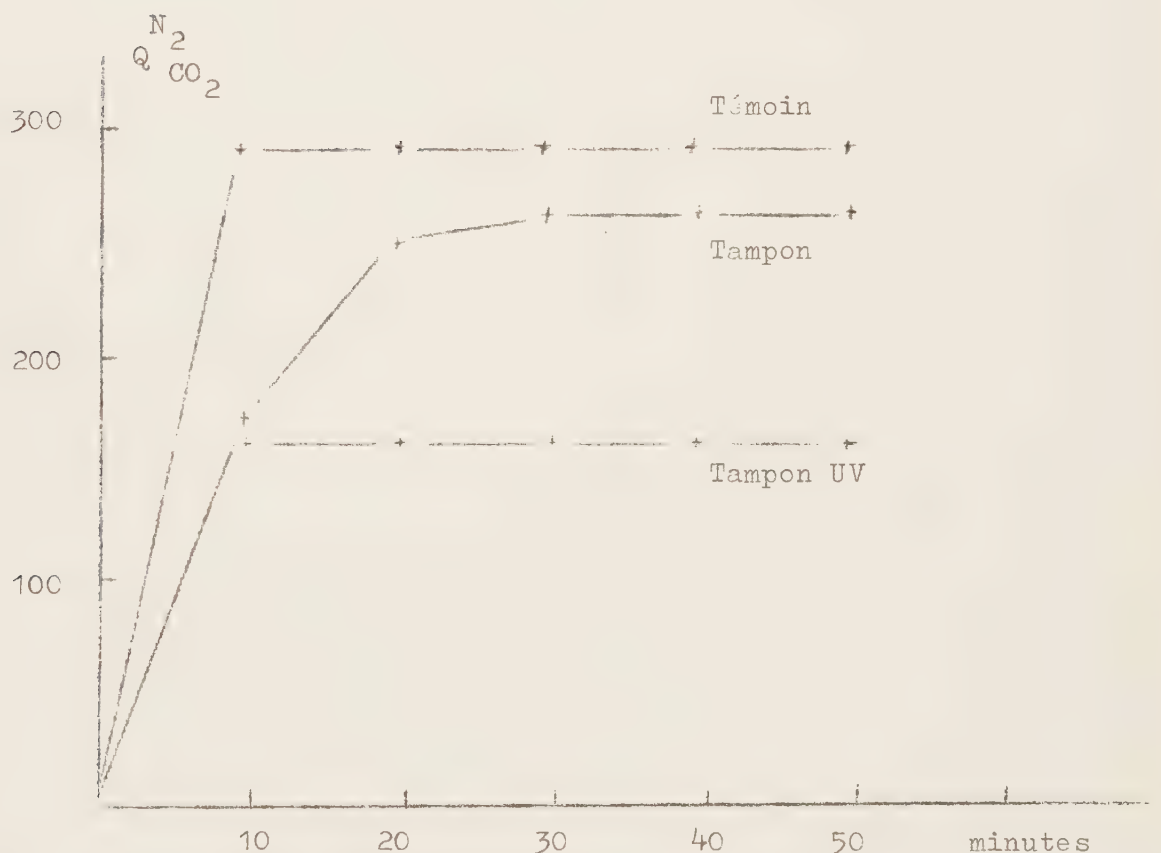


Figure 22.: Influence de l'irradiation dans l'ultraviolet sur l'évolution du pouvoir fermentaire après 7 heures d'incubation dans le tampon non glucosé.

VI. VARIATIONS ENZYMATIQUES DANS LE METABOLISME FERMENTAIRE

L'analyse des conditions physiologiques qui déterminent les variations du pouvoir fermentaire a montré que la multiplication cellulaire peut être considérée comme un facteur indispensable au maintien de la capacité fermentaire d'une levure.

En effet, dès l'arrêt de la croissance l'on constate une diminution lente de la vitesse de fermentation se stabilisant en fin de fermentation à environ 50% de la valeur obtenue au cours de la phase exponentielle de croissance.

Nous pouvons dès lors admettre que la vitesse d'utilisation d'un des sucres fermentescibles du moût (glucose, maltose maltotriose) est limitée par l'activité d'un des enzymes de la chaîne métabolique. En conséquence toute variation du pouvoir fermentaire devrait nécessairement avoir une répercussion directe sur le potentiel enzymatique de la cellule.

Nous avons tout d'abord voulu vérifier si la vitesse de fermentation "in vitro" variait dans les mêmes proportions que celles observées "in vivo". A cet effet nous avons étudié quelques paramètres qui pouvaient influencer la reproductibilité des résultats notamment: le pH, la durée du traitement aux ultrasons, la nature du tampon(phosphate, succinate, phtalate, histidine) et la concentration en levures, phosphate et glucose.

L'ensemble des résultats obtenus nous a amenés à utiliser les conditions suivantes: ultrasonnage pendant 10 minutes à 0°C de 20 cc d'une suspension contenant 5 gr. de levure humide dans un tampon histidine M/450 pH 6. Cellules entières, parois et débris cytoplasmiques sont éliminés par 10 minutes de centrifugation à 32.000 g à 0°C. Les mesures manométriques se font sur 1 cc d'extrait et 0,5 cc d'une solution contenant: 50 μ M de glucose et 40 μ M de

phosphate, (volume total 1,5 cc) la température étant de 30°C. Le dosage des protéines dans l'extrait est effectué par la méthode au biuret.

Dans ces conditions nous obtenons des pouvoirs fermentaires (μ l de CO₂ dégagés par heure et par mg de protéines) semblables, que les levures soient récoltées au début ou en fin de fermentation ou encore après incubation dans un tampon phosphate glucosé à pH 4,5. Suivent ci-après quelques résultats début et fin de fermentation sur milieu complet:

levures entières :	530 et 221; 426 et 192; 356 et 184
extrait :	169 et 146; 153 et 135; 162 et 167

Il est toutefois difficile de tirer des conclusions définitives suite à ces résultats. En effet, le traitement aux ultrasons pourrait non seulement libérer l'activité de certains enzymes liés à des sites bien déterminés, mais également stimuler l'activité ATP-asiqne et de ce fait entraîner une diminution de la teneur en ATP de l'extrait par rapport aux cellules entières.

Ces raisons nous ont amenés à doser quelques enzymes intervenant dans la dégradation anaérobie du glucose et du maltose. Les résultats exposés dans la suite du présent travail concernent principalement en la mise au point des dosages enzymatiques en extrait brut. Il faut en effet tenir compte du fait que la désintégration mécanique des cellules provoque une désorganisation complète de l'ensemble des activités enzymatiques de la cellule. Il en résulte que l'activité d'un enzyme "in vitro" n'est pas nécessairement comparable à son activité "in vivo".

Dans le but de détourner cette difficulté nous avons déterminé la vitesse d'activité maximum (saturation en substrat) en récoltant des cellules dans des états physiologiques correspondant à des vitesses de fermentation : différentes. (phase exponentielle de croissance et phase stationnaire tardive)

Nous discuterons ci-après le dosage de l'hexokinase, de l'aldolase et de l' α glucosidase.

I. HEXOKINASE

Cet enzyme catalyse la réaction suivante:



L'hexokinase de la levure catalyse la phosphorylation du D-glucose, du D-fructofuranose (40), du D-mannose (79), de la D-glucoseamine (11) et du 2 déoxy-D-glucose.(22)

Récemment KAJI, TRAYSER et COLLOWICK (75) ont montré que l'hexokinase présente des formes moléculaires multiples se différenciant exclusivement par des propriétés de charge. L'établissement du profil d'élution, d'une hexokinase recristallisée par chromatographie sur diéthylaminoéthyl (DEAE) cellulose permet d'identifier six pics. Les deux premiers constituants sont élués par un gradient de pH (fraction I) les quatre derniers par un gradient de chlorure de Sodium.(fraction II) Les propriétés catalytiques et physiques de toutes les fractions sont identiques. La conversion de la Fraction I en Fraction II peut être réalisée soit, par traitement à la trypsine ou la chymotrypsine soit, par autolyse de la levure. La signification de ces résultats n'est toutefois pas claire.

1) Principe et technique de dosage:

La méthode utilisée est celle de SOLS et COLL. (136) qui mesure le glucose non phosphorylé par l'hexokinase à l'aide de la glucose oxydase. (glucostat spécial ne contenant pas de maltose, d'amylase et d'invertase: Worthington Biochemical Corp.) La réaction est arrêtée en présence d'EDTA.

a) conditions de dosage enzymatique:

On prépare les solutions suivantes:

1. substrat	glucose	0,002 M.
	ATP	0,008 M.
	MgCl ₂	0,008 M.
	Bleu de bromothymol	
		0,0002%

Le pH est ajusté à 7.

2. glucose oxydase: gluco-stat contenant:

Triton	X 100	0,2%
EDTA		0,01 M.
PO ₄		0,05 M.

Le pH est ajusté à 7.

Le système complet de dosage contient:

substrat	0,1 cc.
extrait	0,05 cc. (0,4 mg de protéines par cc.)

Après 10 minutes d'incubation à 30°C. on ajoute 2 cc. de glucose oxydase contenant l'EDTA.

Après 2 heures d'incubation on détermine le glucose formé en mesurant la densité optique à 450 mμ. A cet effet on utilise une courbe étalon pour le glucose.

Un standard et un blanc sont utilisés pour chaque série d'essais. Le standard contient tous les constituants mais l'activité de l'hexokinase est arrêtée en ajoutant immédiatement la glucose oxydase et l'EDTA.

Un tube ne contenant pas de glucose sert de blanc.

L'activité de l'hexokinase est exprimée par le nombre de μ moles de glucose phosphorylé par heure et par mgr de protéines.

b) préparation de l'extrait:

La croissance est arrêtée par centrifugation à 3.000 g. Les culots de levure sont ensuite remis en suspension, 5 gr de poids humide étant repris dans 12 cc d'eau bidistillée contenant 0,005 M par litre D'EDTA. Cette suspension est alors soumise aux ultrasons pendant 10 minutes à 0°C. dans un appareil

Raytheon DF/101 (250 W.10Kc.) L'extrait est ensuite centrifugé à 34.000g pendant 5 minutes. Le liquide surnageant est conservé à 0°C. et constitue l'extrait.

2) Résultats

a) variations de l'activité de l'hexokinase au cours du cycle de la croissance en anaérobiose:

Afin d'établir un parallélisme éventuel entre les résultats physiologiques et enzymatiques nous avons été amenés à étudier l'évolution du taux d'activité de l'hexokinase au cours de la croissance anaérobie.

Les essais ont été effectués à l'aide de la souche 106 cultivée en anaérobiose (agitation magnétique et barbotage de CC_2) sur milieu complet contenant 10% de glucose et 0,3% d'extrait de levures.(Difco) Chaque culture estensemencée à une d.o. de 0,100 avec une préculture de 5 jours sur le même milieu.

Des cellules récoltées au cours de la phase exponentielle de croissance présentent une activité qui correspond à 25 μ moles de glucose phosphorylé par heure et par mg de protéines.(23 à 28 μ moles)

En fin de fermentation cette activité ne représente plus que 50% de sa valeur initiale soit 10 à 15 μ moles.

Nous pourrions donc conclure à une évolution parallèle entre la vitesse de fermentation et l'activité de l'hexokinase. Dans le but de vérifier cette hypothèse nous avons effectué des dosages enzymatiques au cours de la croissance anaérobie aux endroits indiqués sur la figure 23.

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 44.

Evolution du taux d'activité de l'hexokinase au cours de la croissance anaérobie.

prélèvement	d.o. culture	glucose restant	N_2 Q_{CO_2}	activité spé- cifique M glucose phos- phorylé heure/ mg protéines
1	0,560	90	487	22,2
2	1,2	70	430	23,6
3	1,25	60	307	19
4	1,25	45	273	16,3
5	1,25	22	195	14
6	1,25	0	180	10,2

Quoiqu'il existe un certain parallélisme entre les résultats physiologiques et enzymatiques, il est toutefois certain que la vitesse de fermentation décroît plus rapidement au début de la phase stationnaire. Ces résultats semblent par conséquent plutôt en faveur de deux mécanismes régulateurs ayant une action complémentaire. En effet, pour autant que l'activité de l'hexokinase puisse constituer un facteur limitant de la vitesse de dégradation anaérobie du glucose on ne pourrait attribuer la diminution du pouvoir fermentaire à ce seul facteur.

b) variations de l'activité de l'hexokinase au cours de la croissance anaérobie en présence d'actidione

Des essais ont été réalisés en ajoutant de l'actidione à une concentration de 2 p.p.m. au début de la phase exponentielle de croissance. (d.o. 0,280) Le pouvoir fermentaire et l'activité de l'hexokinase sont ensuite déterminés après 4 heures d'incubation. Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 45.

Influence de l'actidione sur l'activité de l'hexokinase.

actidione	temps	d.o.	N_2 Q_{CO_2}	activité spé- cifique μ M glucose phos- phorylé/heure/mg proté- ines.
-	0 H	0,070	178	-
-	5 H	0,280	433	31,3
+	4 H	0,292	188	19,3

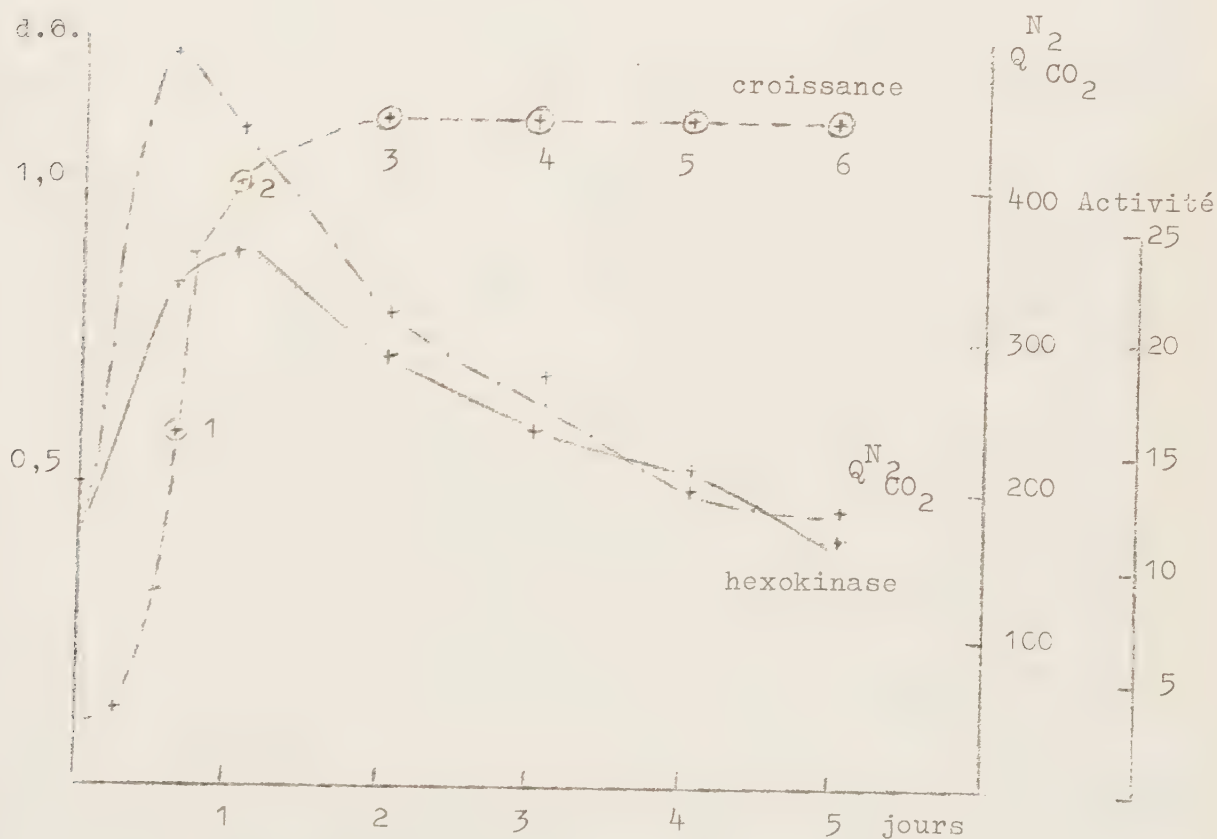


Figure 23.: Evolution du pouvoir fermentaire et du taux d'activité de l'hexokinase au cours de la croissance anaérobie.

Nous remarquons que l'activité spécifique de l'hexokinase diminue considérablement après 4 heures d'incubation anaérobie en présence d'actidione. Le faible accroissement de la masse cellulaire ne permet pas d'expliquer les variations de l'activité enzymatique.

Notons également que la vitesse de fermentation diminue plus rapidement (60%) que l'activité de l'hexokinase. (40%) Par conséquent cet enzyme ne deviendrait limitant qu'après un temps d'incubation prolongé en absence de multiplication cellulaire.

II.- ALDOLASE

Cet enzyme catalyse la réaction suivante:

Fructose 1,6 - diphosphate $\longrightarrow$ glycéraldéhyde - 3 - phosphate + dihydroxyacétone phosphate.

1) Principe et techniques de dosage:

Différentes méthodes ont été proposées pour le dosage de cet enzyme. Celles-ci peuvent se résumer comme suit:

- a) apparition de phosphates alcali labiles.
- b) dosage colorimétrique des trioses formés en présence de 2-4 dinitro-phényl-hydrazine. (131)
- c) mesure de l'absorption à 240 m en présence d'hydrazine résultant de la formation d'hydrazones avec les trioses. (72)
- d) dosage enzymatique des trioses phosphates à l'aide de la glycéraldéhyde-phosphate deshydrogénase.

1. en présence d'un excès de phospho-glycéraldéhyde deshydrogénase, l'augmentation de l'absorption à 340 m est proportionnelle à la vitesse de formation de glyceraldéhyde - 3 - phosphate par l'aldolase. (14)

2. en absence d'isomérase le déhydroxyacétone phosphate est réduit en α glycérophosphate en présence de NADH_2 . On mesure alors la diminution de l'absorption à 340 m μ . (129)

e) détermination colorimétrique du fructose di phosphate formé par l'aldolase à partir des trioses phosphates. (129)

Le dosage enzymatique des trioses phosphates ne peut être utilisé en extrait brut qui contient des enzymes permettant la réoxydation du NADH_2 formé. Quoiqu'aucune méthode ne soit absolument satisfaisante, nous avons retenu celle de SIBLEY-LEHNINGER qui consiste à bloquer les trioses par la 2-4 dinitrophenylhydrazine. D'après LOWRY (86) la coloration n'est stable qu'en milieu organique. (méthyl cellosolve) En effet, lors de nos premiers essais, nous avons constaté la formation d'un précipité. Signalons d'autre part que la méthode de SIBLEY-LEHNINGER (muscle) est mal adaptée au dosage de l'aldolase chez la levure. En effet, si l'aldolase du muscle est stable entre pH 6 et 9, l'aldolase de la levure présente une activité maximum à pH 7,3 et une perte sensible d'activité à un pH plus élevé. Les essais ont donc été effectués à pH 7,3 en remplaçant le tampon TRIS (effet inhibiteur sur l'aldolase) par la triéthanolamine. L'alcalinisation se fait à la soude en solution dans un mélange eau-éthylèneglycol. (1:2 v/v)

Ces modifications ont été introduites en tenant compte des observations de LOWRY (86) et de RICHARDS et RUTTER. (124)

La courbe étalon peut être rétablie en utilisant soit un mélange de trioses phosphates, soit la glycéraldéhyde. (4)

a) conditions de dosage enzymatique

Le système de dosage complet contient:

Triéthanolamine (10^{-1} M) pH 7,3	1 cc
Fructose di phosphate - Sel.Mg($5 \cdot 10^{-2}$ M)	0,25 cc
Hydrazine ($2,2 \cdot 10^{-1}$ M)	0,25 cc
Acétate de K. (M)	0,25 cc
Extrait (0,1 mg de protéines par cc)	0,25 cc
Eau bidistillée	0,5 cc

Après 10 minutes d'incubation à 30°C la réaction est arrêtée par ajout de 2 cc de TCA à 10%. On prélève, après centrifugation 1 cc de surnageant en alcalinise par 1 cc de NaOH 0,75 N. On laisse au repos pendant 30 minutes à la température ordinaire puis on ajoute 1 cc d'une solution contenant 990,6 mg de 2-4 dinitro-phenylhydrazine par litre d'HCl. Après 60 minutes de réaction à la température ordinaire on réalcalinise par 7 cc d'NaOH 0,75 N. (solution dans eau-éthylène glycol 1:2 V/v) On mesure l'absorption à 540 m μ après 45 minutes.

Le blanc contient tous les réactifs sauf le fructose di phosphate qui n'est ajouté qu'après l'arrêt de la réaction par le TCA.

La courbe étalon est établie à l'aide d'une solution equi moléculaire des deux trioses phosphates.(BOEHRINGER) L'activité de l'aldolase est exprimée par le nombre de μ moles de fructose di phosphate transformé par heure et par mg de protéines.

b) préparation de l'extrait:

Les conditions sont celles utilisées dans le cas de l'hexokinase. (5 gr de levure humide dans 12 cc de triéthanolamine 0,1 M pH 7,3)

2) Résultatsa) variations de l'activité de l'aldolase au cours du cycle de la croissance en anaérobiose:

Les essais ont été effectués à l'aide de la souche 106 cultivée en anaérobiose.

Il ressort de la comparaison des résultats physiologiques et enzymatiques que les variations du pouvoir fermentaire n'ont aucune répercussion sur le taux d'activité de l'aldolase.

L'activité spécifique reste stable, que les cellules soient récoltées au cours de la phase exponentielle de croissance ou au cours de la phase stationnaire.

Le tableau suivant exprime les résultats obtenus au cours d'une croissance anaérobie. Les prélèvements ont été effectués aux endroits indiqués sur la figure 24.

Tableau 46.

Evolution du taux d'activité de l'aldolase au cours de la croissance anaérobie.

prélèvement	d.o. culture	glucose restant	N_2 Q CO_2	activité spé- cifique μM F.D.P. trans- formé Heure/ mg protéines.
1	0,285	97	343	102
2	0,305	95	426	97
3	0,330	94	464	90
4	0,465	92	449	89
5	1,25	60	242	100
6	1,25	20	182	88

En conclusion les variations de la vitesse de fermentation ne pourraient être attribuées au taux d'activité de l'aldolase.

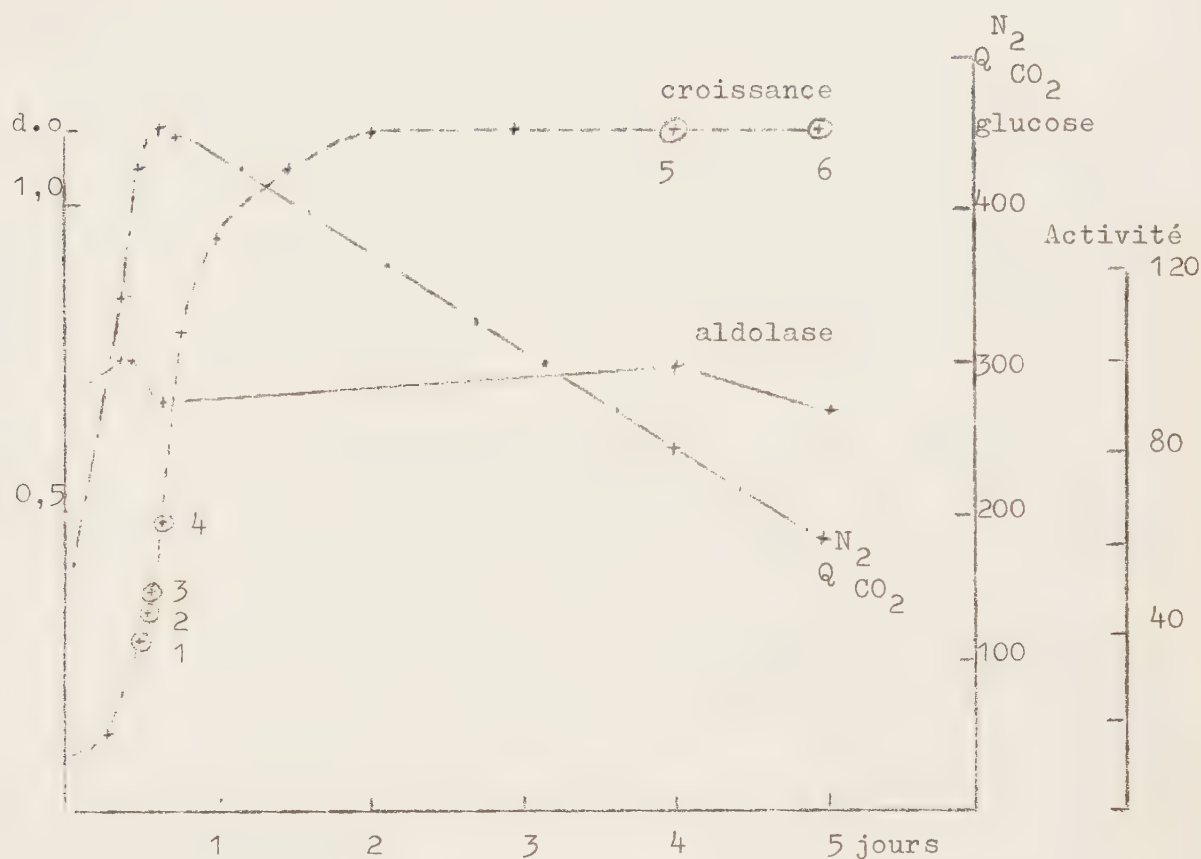


Figure 24. Evolution du pouvoir fermentaire et du taux d'activité de l'aldolase au cours de la croissance anaérobie.

b) variations de l'activité de l'aldolase au cours de la croissance anaérobie en présence d'actidione:

Les conditions expérimentales sont celles utilisées dans le cas de l'hexokinase.

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau 47.

Influence de l'actidione sur l'activité de l'aldolase.

actidione	temps	d.o. culture	N ₂ Q CO ₂	activité spécifique μ M F.d.P. transformé/heure/ mg protéines
-	0 H	0,080	175	-

-	4 H	0,285	343	103
+	4 H	0,293	112	106

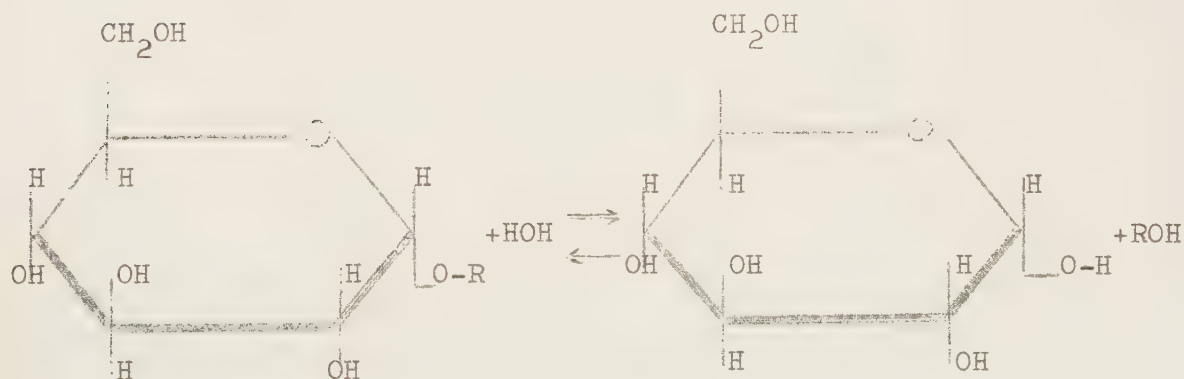
Comme on le remarque l'activité de l'aldolase reste stable, après 4 heures d'incubation en présence d'actidione alors que dans ces mêmes conditions la vitesse de fermentation diminue considérablement.

Ces résultats appuient sensiblement l'hypothèse que l'hexokinase pourrait jouer un rôle central dans la régulation du métabolisme fermentaire en absence de multiplication cellulaire.

Notons également que l'accroissement de la masse cellulaire en présence d'actidione n'a aucune incidence directe sur l'activité spécifique des enzymes glycolytiques.

III. α GLUCOSIDASE

Cet enzyme catalyse l'hydrolyse du maltose en glucose. (125) La réaction est réversible mais l'équilibre est en faveur de l'hydrolyse. (41) Notons toutefois que le maltose n'est pas à considérer comme le seul substrat de cet enzyme. Des dérivés du maltose ainsi que certains dérivés aliphatiques et arylés des α -D- glucopyranosides sont également hydrolysés. (49)



1) Principes et techniques de dosage:

La méthode utilisée est celle décrite dans le chapitre II. Les extraits sont préparés par ultrasonnage d'une suspension de levures contenant 5 gr de poids humide dans 12 cc de tampon phosphate 0,067 M à pH 6,8.

2) Résultats:

Variations de l'activité de l' α glucosidase au cours du cycle de la croissance en anaérobiose.

Les essais ont été effectués à l'aide de la souche 106 cultivée en anaérobiose sur milieu complet contenant 5% de maltose et 0,3% d'extrait de levures.

Le tableau suivant exprime l'activité de l' α glucosidase et de l'hexokinase au cours d'une croissance anaérobie. Les prélèvements ont été effectués aux endroits indiqués sur la figure 25.

Tableau 48.

Evolution du taux d'activité de l' α glucosidase et de l'hexokinase au cours de la croissance anaérobie.

prélèvement	d.o. culture	N ₂ Q CO ₂		activité spécifique	
		maltose	glucose	glucosidase μ M maltose hydrolyse/h/mg protéines	hexokinase Mglucose phosphorylé/h/mg protéines
1	0,250	417	312	130	-
2	0,280	474	352	135	31
3	0,880	463	335	125	-
4	1,20	231	204	170	18
5	1,25	154	148	156	-

Comme on le remarquera la diminution de la vitesse fermentaire dès l'arrêt de la croissance est indépendante de la source hydrocarbonée du milieu de culture.

En effet, le pouvoir fermentaire sur glucose et sur maltose diminue parallèlement au cours de la phase stationnaire. Le phénomène ne pourrait être attribué à une variation de l'activité de l' α glucosidase puisque celle-ci augmente même légèrement en fin de fermentation.

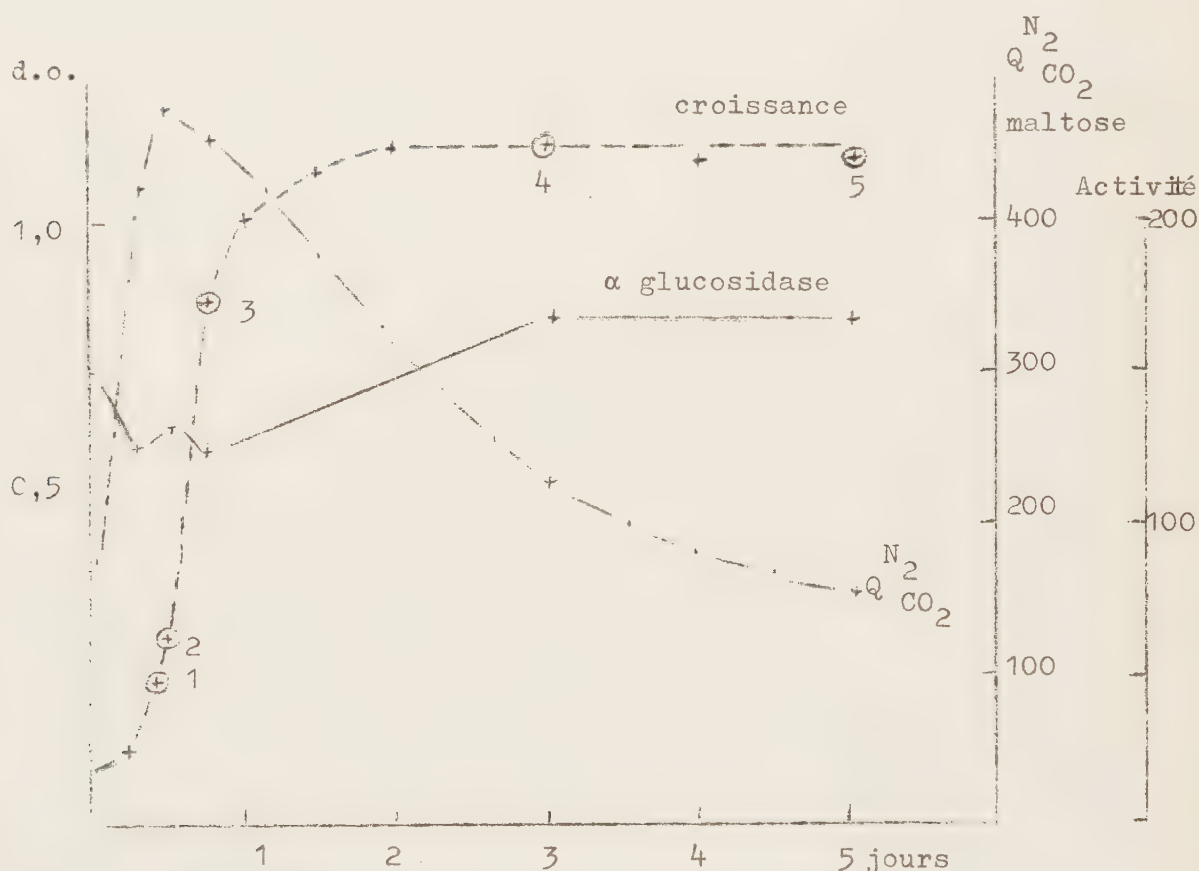


Figure 25.: Evolution du pouvoir fermentaire et du taux d'activité de l' α glucosidase au cours de la croissance anaérobie.

Pour un grand nombre d'essais, les valeurs obtenues oscillent entre 125 et 135 μ moles de maltose transformé par heure et par mg de protéines pour des cellules récoltées au cours de la phase exponentielle de croissance et 140 à 180 μ moles au cours de la phase stationnaire.

Par contre l'évolution de l'activité spécifique de l'hexokinase se caractérise une fois de plus par une perte d'activité en fin de fermentation.

CONCLUSIONS

La dégénérescence se caractérise principalement par un ralentissement de la vitesse de fermentation et par des écarts de plus en plus importants entre l'atténuation limite et l'atténuation obtenue fin fermentation.

L'analyse des conditions physiologiques qui déterminent les variations du pouvoir fermentaire a montré que la multiplication cellulaire peut être considérée comme un facteur indispensable au maintien de la capacité fermentaire de la levure. En effet, dès l'arrêt de la croissance on constate une diminution lente de la vitesse de fermentation se stabilisant en fin de fermentation à environ 50% de la valeur obtenue au cours de la phase exponentielle de croissance.

Des déterminations manométriques effectuées sur des cellules récoltées au cours de la phase de latence ont montré que la valeur maximum est atteinte au début de la phase exponentielle.

Cette vitesse maximum dépend toutefois de la composition du milieu de culture. Les facteurs suivants ont été envisagés:

a) concentration en glucose du milieu

Nous obtenons avec 10%, 2% et 0,15% de glucose les pouvoirs fermentaires suivants: 500; 400 et 355. Le palier est donc plus élevé pour de fortes concentrations en glucose

mais les valeurs ne sont pas proportionnelles à la quantité de sucre.

b) composition en acides aminés et en vitamines:

Le palier atteint dans le cas d'un milieu minéral contenant 0,5% d'un hydrolysate de caséine et d'un tampon glucosé également additionné de 0,5% d'acides aminés est le même. ($Q_{CO_2}^N$ 300)

L'ajoute de vitamines ne semble donc pas influencer le rétablissement du pouvoir fermentaire.

c) concentration en alcool:

L'addition de 5% d'alcool à un milieu complet diminue la vitesse maximum de fermentation. ($Q_{CO_2}^N$ 300 au lieu de 400)

d) concentration en levures:

Plus la concentration en levures à l'ensemencement est élevée, plus le $Q_{CO_2}^N$ maximum sera faible.

Notons également que la vitesse maximum (état d'équilibre atteint au début de la croissance) ne semble pas influencée par l'apparition d'un facteur limitant dans le milieu. En effet, un transfert dans un nouveau milieu ne modifie pas le pouvoir fermentaire.

Dans ces conditions nous pourrions admettre que les variations du métabolisme fermentaire de la levure seraient déterminées par une succession d'états d'équilibre entre synthèses et dégradations.

Dans le but de vérifier les résultats obtenus jusqu'à présent nous avons effectué une étude systématique des différents paramètres métaboliques en relation avec la stabilité des enzymes glycolytiques. Il en résulte qu'une incubation en absence d'une source d'azote dans un tampon phosphate glucosé diminue considérablement la capacité fermentaire de la levure sans augmentation sensible de la mortalité. Après 7 heures d'in-

cubation, nous trouvons 5% de cellules mortes; 10% après 16 heures et 16% après 20 heures. Jusque 7 heures il n'existe par conséquent aucune relation entre le taux de mortalité et le fléchissement de la capacité fermentaire de la levure. Par contre, après 16 heures d'incubation la perte supplémentaire du pouvoir fermentaire dépend partiellement de l'accroissement de la mortalité. Il semble par conséquent exister un seuil au-dessus duquel le phénomène devient irréversible. L'étude a été faite pour trois levures: une levure de boulangerie, une levure haute et une levure basse.

La perte du pouvoir fermentaire est non seulement un caractère propre à chaque levure mais, dépend également des conditions préalables de croissance. Nous basant sur la moyenne des intensités relatives pour les trois levures, nous trouvons une valeur de 0,50 après croissance aérobie et de 0,40 après croissance anaérobie.

Il faut toutefois tenir compte du fait que le pouvoir fermentaire des levures récoltées en aérobose est nettement moins élevé que celui des cellules récoltées en anaérobiose. Cet écart semble devoir être attribué à l'inhibition de la fermentation par la respiration.

LYNEN (87) explique l'effet Pasteur par un épuisement de la réserve intracellulaire de phosphate inorganique indispensable au fonctionnement de la glycéraldéhyde phosphate deshydrogénase.

D'autre part les phosphorylations oxydatives entraîneraient une accumulation de l'ATP dans les mitochondries et inhiberaient de ce fait les phosphorylations extra mitochondriales au niveau de l'hexokinase et de la phosphohexokinase. Nous savons en effet que les enzymes respiratoires sont liés aux mitochondries et que les enzymes glycolytiques sont localisés dans la fraction soluble du cytoplasme. (66,83, 120, 130).

A première vue nous pourrions également attribuer la perte du pouvoir fermentaire tout au moins après croissance

et incubation aérobie à l'effet Pasteur. Cette interprétation ne permet toutefois pas d'expliquer les résultats obtenus après croissance et incubation anaérobie. Notons encore que si l'incubation se fait en absence de glucose, nous obtenons une perte transitoire du pouvoir fermentaire avec rétablissement de la vitesse maximum de fermentation après 40 minutes.

Guidés par les travaux soulignant le rôle de la réserve intracellulaire d'acides aminés libres de la levure dans la biosynthèse des protéines nous avons montré que la stabilité du potentiel enzymatique dépend de la composition de cette réserve. Ceci permet de penser que la levure épuise sa réserve d'acides aminés pendant la première heure d'incubation permettant ainsi la stabilisation de son pouvoir fermentaire. Une incubation prolongée détruirait alors la majeure partie de sa capacité de fermenter le glucose.

Il suffit de mettre la levure en contact avec une source d'acides aminés comme l'hydrolysate de caséine, après incubation dans un tampon glucosé, pour rétablir la capacité fermentaire. Ceci démontre la réversibilité de la perte du pouvoir fermentaire.

Des expériences analogues avec du moût et de la bière indiquent que seul le moût donne les mêmes résultats que l'hydrolysate de caséine. Nous pouvons par conséquent admettre que ce sont principalement les acides aminés du moût qui permettent de reconstituer la réserve d'azote aminé de la levure qui est à la base de la synthèse protéique.

Les résultats négatifs obtenus avec la bière montrent que la presque totalité des acides aminés du moût ont été utilisés par la levure pendant la fermentation, ce qui confirme les observations de BARTON WRIGHT. (2)

L'incorporation des acides aminés du milieu d'incubation a été confirmée en comparant les pouvoirs fermentaires avant et après irradiation des cellules dans l'ultraviolet.

En effet, après irradiation l'hydrolysât de caséine n'est plus capable de stimuler le pouvoir fermentaire de la levure. D'autre part, nous avons vu que la levure ne peut utiliser sa réserve en acides aminés en absence de glucose ce qui explique l'adaptation à la fermentation du glucose après incubation dans un tampon phosphate non glucosé. Or, l'irradiation des cellules après inanition dans le tampon seul annule complètement le rétablissement de la capacité fermentaire.

Il semble donc probable que la biosynthèse des enzymes glycolytiques se fasse consécutivement à l'incorporation des acides aminés intracellulaires dès l'addition du substrat hydrocarboné.

La dégradation anaérobie du glucose avec formation d'alcool éthylique et de CO_2 est assurée par la participation de onze enzymes. Nous pouvons donc admettre que la vitesse de transformation d'un des sucres fermentescibles du moût (glucose, maltose ou maltotriose) est limitée par un des enzymes de la chaîne métabolique. En conséquence toute variation du pouvoir fermentaire devrait nécessairement avoir une répercussion directe sur la constitution enzymatique de la cellule.

Ceci nous a amenés à établir les conditions nécessaires (saturation en substrat et stabilité de la vitesse de réaction en fonction du temps) pour le dosage de l'hexokinase, l'aldolase et l' α glucosidase, afin d'établir un parallélisme éventuel entre les résultats physiologiques obtenus jusqu'à présent et le taux d'activité de ces enzymes.

Des cellules récoltées au cours de la phase exponentielle de croissance présentent des activités comprises entre 23 et 28 μ moles de glucose phosphorylé par heure et par mg de protéines. En fin de fermentation cette activité ne représente plus que 50% de sa valeur initiale soit 10 à 15 μ moles. Notons toutefois que la vitesse de fermentation décroît plus rapidement que l'activité de l'hexokinase au début de la phase stationnaire.

Aussi faudrait-il admettre qu'un mécanisme régulateur double ou la diminution de l'activité spécifique de l'hexokinase résulterait de l'apparition d'un facteur limitant au niveau d'un des enzymes intervenant dans le processus catabolique. L'inhibition allostérique de la phosphofructokinase par l'ATP serait à envisager comme une explication possible du phénomène.

Par contre, l'activité de l'aldolase et de l' α glucosidase varie peu ou pas au cours du cycle de la croissance en anaérobiose. Pour un grand nombre d'essais les valeurs obtenues dans le cas de l'aldolase oscillent entre 80 et 100 μ moles de fructose di phosphate transformé par heure et par mg de protéines.

D'autre part, le taux d'activité de l' α glucosidase début et fin de fermentation varie entre 130 et 160 μ moles de maltose hydrolysé par heure et par mg de protéines.

En conclusion, parmi les enzymes dosés jusqu'à présent seule l'hexokinase semble jouer un rôle central dans la régulation du métabolisme fermentaire de la levure en absence de multiplication cellulaire.

Il est intéressant de noter que toutes les conditions physiologiques qui ont une incidence sur la dégradation intracellulaire des protéines entraînent également une diminution de la vitesse de fermentation. Nous avons vu que les protéinases se trouvent sous une forme inactive liées aux ribosomes, tout arrêt ou ralentissement de la croissance provoque leur activation et entraîne de ce fait une dégradation des protéines de la cellule. (51)

Dans le but de vérifier l'intervention de systèmes hydrolytiques dans le mécanisme de la régulation des enzymes glycolytiques, nous avons utilisé l'actidione comme inhibiteur de la croissance et des synthèses protéiques. Dans ces conditions l'activité des enzymes protéolytiques et des enzymes de

la fermentation n'est pas inhibée. Nous constatons que la capacité fermentaire de la levure diminue de moitié après deux heures d'incubation en présence d'actidione à la fin de la phase exponentielle de croissance. Cette sensibilité des enzymes de la fermentation alcoolique diminue à fur et à mesure que la croissance progresse. Au cours de la phase stationnaire l'actidione s'avère sans effet sur le métabolisme fermentaire. Des dosages enzymatiques montrent que l'activité de l'hexokinase diminue considérablement après quatre heures d'incubation anaérobie en présence d'actidione. (40%) Dans ces mêmes conditions l'activité de l'aldolase reste constante.

Si ces résultats sont en faveur d'un mécanisme régulateur basé sur une activation des protéinases liées aux ribosomes, ils ne permettent toutefois pas d'exclure une inhibition éventuelle de certains enzymes de la glycolyse par une accumulation de métabolites (ATP) due à un arrêt ou à un ralentissement des processus biosynthétiques.

+ . + . + . + . + . +

DISCUSSION GENERALE

E T

CONCLUSION

La caractérisation de souches de levures appartenant à une même espèce (*S. cerevisiae* ou *S. carlsbergensis*) n'est possible que dans la mesure où l'on s'adresse à un ensemble d'activités métaboliques basées sur des mécanismes biochimiques et génétiques distincts.

Parmi ces derniers les phénomènes de répression et d'induction semblent les plus intéressants.

L'étude de la vitesse de fermentation du maltose après répression par le glucose permet de classer les levures hautes en plusieurs groupes. Certaines souches fermentent constitutivement le maltose, d'autres se caractérisent par une diminution plus ou moins rapide du pouvoir fermentaire sur maltose après croissance sur glucose.

Il est particulièrement intéressant de noter que la vitesse d'utilisation du maltose se stabilise à des niveaux très différents après plusieurs transferts successifs. Dans la plupart des cas la vitesse reste appréciable, (25 à 50% de la valeur obtenue après croissance sur maltose) même après cinq générations sur milieu glucosé.

Nous avons vu que l'utilisation du maltose chez la levure est contrôlée par six gènes non liés. HALVORSON, WINDERMAN et GORMAN (50) ont montré que les gènes M sont des gènes de structure. Le fait que le système est inductible à l'état dominant semble toutefois indiquer la participation de sites de contrôle bien déterminés.

Récemment l'étude de la synthèse induite de la β -galactosidase chez E. coli a conduit JACOB et MONOD à élaborer un modèle général pour la régulation génétique de la synthèse protéique. (69, 70, 71)

Aussi dans les systèmes inductibles (ex. β -galactosidase) l'addition d'un inducteur approprié (β -galactoside) et dans les systèmes répressibles (ex. ornithine transcarbamylase) (39) l'élimination d'un métabolite répresseur (arginine) se traduisent par un accroissement très considérable du taux différentiel de synthèse de l'enzyme. ($\Delta E / \Delta d.o.$)

Le contrôle de la synthèse d'un enzyme inductible ou répressible est effectué par deux types de gènes de régulation: un gène opérateur et un gène régulateur.

Le gène opérateur détermine la transcription de l'ARN messenger produit primaire des gènes de structure situés sur le même chromosome. L'ensemble forme une unité d'activité intégrée appelée opéron.

Le gène régulateur permet la synthèse d'un répresseur cytoplasmique qui présente une activité spécifique pour le gène opérateur. Sa fixation bloque la transmission d'information de l'opéron. Les répresseurs ont la propriété de réagir avec de petites molécules comme le lactose et l'arginine. (effecteurs) Dans un système inductible seul le répresseur peut s'associer avec le gène opérateur, la synthèse du ou des enzymes n'est alors possible qu'en présence de l'effecteur. (inducteur) Par contre dans un système répressible c'est le complexe répresseur-effecteur qui est actif.

L'application de ce modèle à l'utilisation du maltose (système inductible) permet de prévoir une vitesse de fermentation nulle après un nombre suffisant de générations sur milieu glucosé pour autant que les six gènes de structure M se trouvent chacun sous contrôle d'un gène régulateur.

Comme tel ne semble pas le cas et que toutes les souches examinées jusqu'à présent sont inductibles nous pouvons émettre deux hypothèses:

- A. un ou plusieurs des gènes de structure M ne se trouvent pas sous contrôle d'un gène régulateur. Dans ce cas la constitutivité de la souche 173 s'expliquerait par une inactivation totale des gènes régulateurs. (i^-)
- B. un ou plusieurs des gènes opérateurs ne s'associeraient plus avec le répresseur cytoplasmique formé par le gène régulateur correspondant. (o^c)

Nous avons vu que les souches de *S. cerevisiae* et *S. carlsbergensis* utilisées en brasserie sont généralement polypoïdes. (29) Dans ces conditions l'interprétation des phénomènes d'induction et de répression s'avère extrêmement difficile.

Dans le but de détourner cette difficulté nous avons isolé par sporulation successive deux cultures monospores à partir des souches 106 et 173.

La souche 173/2/3 est constitutive et la souche 106/6/2 se caractérise par une dilution du taux d'activité de l' α glucosidase qui est proportionnelle à l'accroissement de la masse cellulaire tout au moins pendant la première génération sur milieu glucosé.

Des essais de conjugaison peuvent dès lors être envisagés afin de vérifier les hypothèses formulées ci-dessus. En effet, la constitutivité par inactivation des gènes régulateurs serait un facteur récessif dans un diploïde hétérozygote par rapport à ce caractère. Ce même caractère serait dominant dans le cas d'une suppression de l'affinité du gène opérateur pour le répresseur cytoplasmique.

Les levures basses forment un groupe beaucoup plus homogène se caractérisant par une diminution très rapide du pouvoir fermentaire sur maltose. En général la vitesse d'uti-

lisation minimum est atteinte pour un accroissement de la masse cellulaire de 20% en présence de glucose. Un arrêt du taux différentiel de synthèse de la maltozymase ne permet pas d'expliquer ces résultats. En effet, la vitesse d'utilisation du maltose représenterait dans ces conditions 80% de la valeur initiale. Puisque celle-ci ne s'élève plus qu'à 10% nous serions amenés à admettre un système de régulation de la fermentation du maltose par le glucose autre que celui basé sur la répression.

Quel que soit ce mécanisme il faudrait envisager une inhibition ou une inactivation d'un des enzymes intervenant dans le transport et l'hydrolyse de ce disaccharide. A cet effet une analyse des propriétés physiques et chimiques de l' α glucosidase pourrait être envisagée.

La régulation métabolique de plusieurs activités enzymatiques (succinique deshydrogénase (44, 45) glucosidase, perméase du maltose et du maltotriose) par le glucose pourrait par ailleurs être considérée comme un critère valable dans la caractérisation biochimique de *S. carlsbergensis*.

Les conditions qui déterminent la répression de la synthèse de la maltozymase ont été précisées dans le cas d'une souche de *S. cerevisiae* se caractérisant par une diminution de la vitesse de fermentation proportionnelle à l'accroissement de la masse cellulaire.

Il ressort de ces résultats que l'évolution du pouvoir fermentaire sur maltose dépend essentiellement de la concentration en glucose du milieu de culture. Sur un milieu contenant 2% de glucose la vitesse de fermentation passe par un minimum après deux générations et augmente ensuite graduellement pour atteindre une valeur maximum après environ quatre générations.

Si la croissance s'effectue sur 10% de glucose le pouvoir fermentaire est maintenu à une valeur minimum soit à environ 20% de la valeur obtenue après croissance en présence de l'inducteur. Des croissances effectuées en présence de dif-

férentes concentrations de glucose ont montré que la vitesse de fermentation diminue à partir de $5.10^{-2}M$. Par contre des concentrations plus faibles en glucose ($8.10^{-3}M$) permettent non seulement de maintenir la vitesse de fermentation à un taux élevé mais permettent également d'augmenter le pouvoir fermentaire après répression par le glucose 10%. Cet accroissement est parallèle à celui observé lorsque la croissance est effectuée en présence de l'inducteur.

Notons également que l'augmentation de la vitesse d'utilisation du maltose observée après incubation en présence de 0,15% de glucose ou 0,15% de maltose est complètement inhibée par l'actidione ou par le p. fluorophénylalanine. Ces résultats nous permettent de conclure à une néosynthèse de protéines actives et à un rôle régulateur double du glucose. (répresseur et inducteur)

Dans le but d'établir une relation entre la vitesse de fermentation et l'activité de l' α glucosidase nous avons dosé l'activité de cet enzyme après répression par le glucose 10%. L'addition de glucose $5.10^{-1}M$ en absence de l'inducteur se traduit par un arrêt du taux différentiel de synthèse de l' α glucosidase. D'autres essais ont montré qu'une préinduction ainsi que l'addition simultanée de glucose et de l'inducteur au milieu de culture ne permettent pas de lever la répression de la synthèse de l' α glucosidase par de fortes concentrations en glucose.

L'hypothèse de la répression catabolique permet de considérer le glucose ou un dérivé du glucose comme le précurseur d'un répresseur inhibant la synthèse de plusieurs enzymes inductibles. (NEIDHARDT et MAGASANIK 1956; (117) ENGLESBERG 1959 (30)

COHN et HORIBATA (19) montrent en effet que la synthèse induite de la β galactosidase chez E.coli est réprimée par plusieurs sources carbonnées. Cette répression est par-

tiellement levée en présence de l'inducteur. Ces arguments seraient donc en faveur d'un site régulateur commun. Que ceci ne semble pas le cas chez la levure ressort des travaux de MAC QUILLAN, WINDERMAN et HALVORSON.

Ces auteurs montrent en effet que chez la levure le taux d'inhibition de la β glucosidase est identique que le système soit inductible ou constitutif. (95) Ces mêmes auteurs montrent d'autre part que différents substrats carbonés (glucose, acétate, lactate, isopropanol, oxaloacétate) exercent une inhibition non compétitive sur la synthèse de la β glucosidase. (95).

Par ailleurs de faibles concentrations en glucose stimulent considérablement la synthèse de cet enzyme et permettent même de dépasser le taux différentiel de synthèse obtenu en présence de β méthylglucoside. (93)

Ces résultats permettent d'envisager un double mécanisme de contrôle le premier (répression) serait non spécifique et inhiberait la libération de l'enzyme de son site de formation: les ribosomes; le second mécanisme au contraire (induction) serait stéréospécifique et agirait au niveau du produit primaire du gène.

En fait HAUGE et COLL. (61) ont montré que le taux de β glucosidase lié aux ribosomes augmente légèrement au cours de la répression par le glucose 10^{-3} M. Or, si au cours de l'induction le taux d'enzymes liés croît (COWIE et COLL. 1961) (21) ce même taux décroît au cours de la répression. (WARREN et GOLDTWAIT 1961) (159)

Récemment, HERMAN et HALVORSON (63) ont identifié trois formes allèles (B^h, m, l) du gène de structure de la β glucosidase chez *S.lactis*. Qu'il s'agit de trois gènes de structure résulte du fait que chaque gène s'exprime indépendamment dans des diploïdes homozygotes et hétérozygotes. L'utilisation de ces souches hétérothalliques a permis d'analyser le contrôle génétique de la synthèse induite de la β glu-

cosidase en présence de glucose ou en présence de β méthylglucoside. (64)

Il résulte des résultats de ce travail que:

- 1) l'inductibilité de la β glucosidase se trouve sous contrôle génétique de deux systèmes indépendants:
 - a) le gène r déterminant l'inductibilité par le β méthylglucoside
 - b) plusieurs gènes $(rg)_n$ déterminant l'inductibilité par le glucose
- 2) ces deux systèmes agissent indépendamment
- 3) la non inductibilité est dominante dans chaque système
- 4) le β méthylglucoside induit spécifiquement la β glucosidase; le glucose pas.

Revenons maintenant à l'effet produit par le glucose 0,15% sur la synthèse de l' α glucosidase chez *S. cerevisiae* après répression par le glucose 10%. Nous remarquerons que la synthèse reprend dès l'addition du glucose et ceci au même taux que celui observé dans le cas du maltose 0,15%.

Notons enfin que la désinhibition induite par de faibles concentrations en glucose est liée à la croissance. Ce résultat inattendu est aussi une preuve indirecte du fait que la synthèse de la maltozymase dépend non seulement de la présence de l'inducteur mais également du taux intracellulaire de catabolites répresseurs.

Ainsi en variant les possibilités de synthèse de la cellule, le glucose 0,15% peut, à la fois, stimuler ou inhiber la synthèse des enzymes intervenant dans l'utilisation du maltose.

En conclusion nos résultats se sont donc limités à une série de faits expérimentaux. Aucune analyse génétique n'a pu être entreprise jusqu'à présent pour des raisons purement techniques. (taux de sporulation et de germination extrêmement faible etc... voir chapitre I. p.) Des ségrégants ont toutefois

pu être isolés, l'un insensible au glucose (173/2/3) l'autre, inductible (106/6/2)

Des essais de conjugaison peuvent dès lors être envisagés afin de vérifier la dominance de chacun de ces caractères. Des perspectives intéressantes au point de vue application industrielle pourraient en résulter et c'est aussi la raison pour laquelle nous poursuivrons ce travail nonobstant la complexité génétique du matériel utilisé.

Nos résultats ainsi que ceux obtenus par HALVCRSON et COLL. permettent de considérer le mécanisme régulateur double du glucose (inducteur et répresseur) comme un caractère propre à un grand nombre d'espèces de levures différentes. (*S. lactis*; *S. fragilis* X *S. dobshanskii*; *S. cerevisiae*; *S. carlsbergensis*)

Aussi pourrions-nous envisager l'existence de deux gènes régulateurs indépendants (maltose et glucose) pour élaborer un modèle pour la régulation génétique de l' α glucosidase chez *S. cerevisiae*.

Nous avons montré, ceci en accord avec les résultats de HARRIS et MILLIN (58), que dans des conditions où la croissance est limitée par la teneur en azote du milieu, le pouvoir fermentaire diminue au cours de la phase stationnaire. Ainsi, l'induction et la répression de la synthèse de l' α glucosidase et de la perméase du maltose et du maltotriose ne sont pas les seuls facteurs qui limitent la vitesse d'une fermentation industrielle.

L'étude de la régulation du métabolisme fermentaire a fait l'objet de la dernière partie du présent travail.

La dégradation anaérobie du glucose avec formation d'alcool éthylique et de CO_2 est assurée par la participation de onze enzymes. Nous pouvons donc admettre que la vitesse du système sera limitée par un ou plusieurs enzymes de la chaîne métabolique.

Remarquons tout d'abord que les fluctuations de la vitesse de fermentation, au cours du cycle de la croissance en anaérobiose sont essentiellement liées aux variations cycliques de l'état physiologique des cellules. Chaque période de croissance entraîne une stabilisation du pouvoir fermentaire et chaque période de fermentation en absence de multiplication cellulaire une diminution de l'efficience par cellule. Comme la phase stationnaire peut être considérée comme une incubation de la levure en absence d'une source d'azote, nous avons étudié les différents paramètres métaboliques qui pourraient intervenir dans la stabilité du pouvoir fermentaire.

Il ressort de ces résultats que le pouvoir fermentaire des cellules, récoltées au cours de la phase exponentielle de croissance diminue de 40 à 50% après 6 heures d'incubation dans un tampon phosphate glucosé. Cette perte partielle de la capacité fermentaire de la levure est réversible puisqu'un prétraitement aérobie par un hydrolysate de caséine permet de rétablir la vitesse de fermentation à 80% de sa valeur initiale.

Qu'il faut conclure à une néosynthèse de protéines actives résulte du fait que l'hydrolysate de caséine s'avère sans effet après irradiation des cellules dans l'ultraviolet.

Partant du principe que toute variation du métabolisme fermentaire devrait avoir une répercussion directe sur la constitution enzymatique de la cellule, nous avons étudié l'évolution du taux d'activité de quelques enzymes glycolytiques au cours du cycle de la croissance en anaérobiose.

Parmi les enzymes dosés jusqu'à présent, (hexokinase, aldolase et α glucosidase) seule, l'hexokinase semble jouer un rôle central dans la régulation du métabolisme fermentaire de la levure.

Des cellules récoltées au cours de la phase exponentielle de croissance présentent une activité qui correspond

à 25 μ moles de glucose phosphorylé par heure et par mg de protéines. (23 à 28 μ moles) En fin de fermentation cette activité ne représente plus que 50% de sa valeur initiale soit 10 à 15 μ moles.

Quoiqu'il existe un certain parallélisme entre les résultats physiologiques au cours du cycle de la croissance, il apparaît toutefois que la vitesse de fermentation décroît plus rapidement au début de la phase stationnaire. Par conséquent, pour autant que l'activité de l'hexokinase puisse constituer un facteur limitant, la diminution du pouvoir fermentaire ne pourrait être attribuée à ce seul facteur.

A cet effet, il nous semble intéressant d'examiner le rôle des coenzymes pyridiniques (NAD) et de l'ATP dans ce processus catabolique. (figure 26)

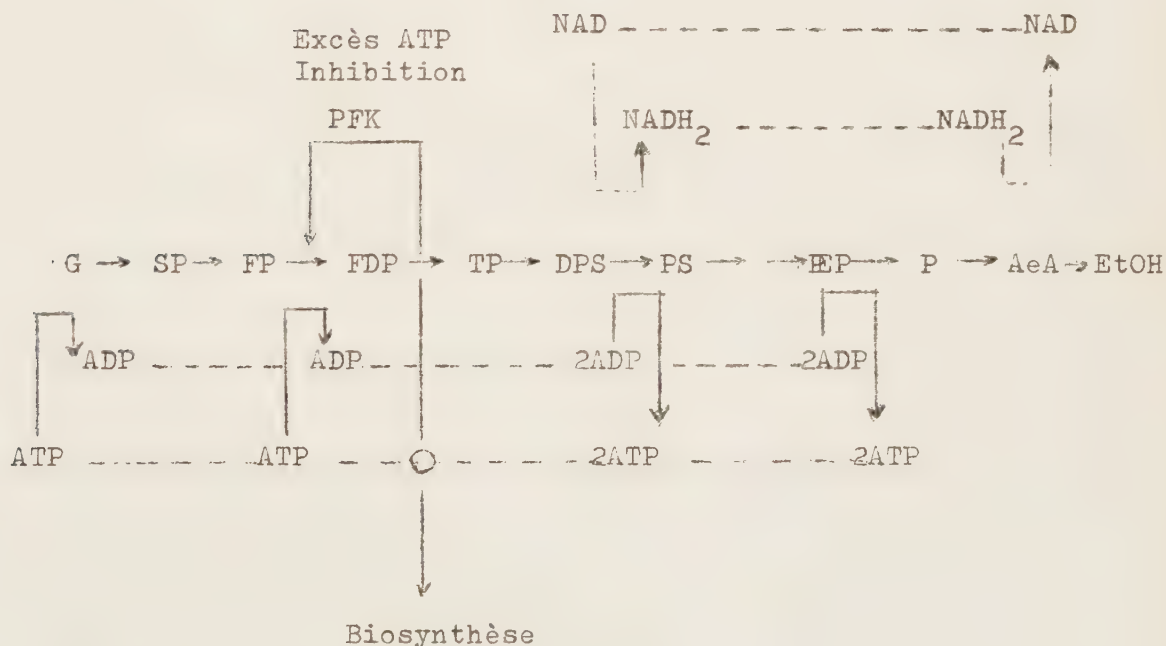


Figure 26.: Rôle des cofacteurs pyridiniques (NAD) et de l'ATP dans la régulation du métabolisme fermentaire.

G: glucose; GP: glucose-6-phosphate; FP: fructose-6-phosphate; FDP: fructose 1-6 diphosphate; TP: triose phosphate; DPG: 1,3-diphosphoglycérate; PG: 2-phosphoglycérate; PEP: phospho-enol-pyruvates; P: pyruvate; AcA: acétaldéhyde; EtOH:éthanol.

Nous remarquons que l'alcool deshydrogénase réalise la réoxydation du NADH_2 nécessaire au fonctionnement de la glycéraldéhyde phosphate deshydrogénase. Le couplage de ces deux réactions assure alors un régime d'équilibre qui ne sera modifié que par l'accumulation de la forme oxydée ou réduite de ce coenzyme.

Qu'il n'en est pas ainsi dans le cas de l'ATP ressort du fait que la voie d'EMP est génératrice d'ATP en anaérobiose. Comme on le remarquera chaque molécule du glucose libère deux molécules d'ATP nécessaires aux besoins énergétiques de la cellule au cours de la croissance. Aussi tout ralentissement des processus biosynthétiques entraînera inévitablement une augmentation du taux intracellulaire d'ATP et une rupture de l'équilibre ATP/ADP.

Ces considérations permettent d'envisager une régulation des enzymes glycolytiques par l'ATP. C'est en fait ce qui a été démontré par VINUELA et COLL. (156) au niveau de la phosphohexokinase. (PFK) Différents auteurs MANSOUR et MANSOUR (104) et PASSONNEAU et LOWRY (121) avaient déjà montré une inhibition de la PFK par un excès d'ATP et sa réversibilité par différents métabolites dans le muscle et chez *Fasciola hepatica*. Les propriétés cinétiques de la PFK de la levure (1) et du muscle (157) indiquent que les deux substrats F6P et ATP n'occupent pas simultanément le même site actif. D'autre part l'activité de cet enzyme diminue avec la concentration en ATP et augmente proportionnellement au carré de la concentration en F 6 P ($1/V$ par rapport $1/F 6 P$ donne une parabole et une droite par rapport $(1/F 6 P)^2$)

Ces résultats suggèrent l'existence de deux sites distincts: un site régulateur et un site actif.

L'ATP agirait alors par rétroinhibition au niveau de la PFK premier enzyme de la voie d'EMP qui assure irréversiblement la formation d'ATP.

Nous avons envisagé ce mécanisme autorégulateur pour expliquer la diminution de la vitesse de fermentation au début de la phase stationnaire.

Dans le but de vérifier cette hypothèse nous avons effectué des incubations en présence de 2-4 dinitrophénol (DNP) qui pourrait diminuer le taux intracellulaire d'ATP en stimulant l'activité ATP asique. (68)

Pour une concentration en DNP de 10^{-6} M nous avons obtenu une augmentation du pouvoir fermentaire de 10% pour des cellules récoltées au cours de la phase exponentielle de croissance et de 25% en fin de fermentation. Ces résultats seraient donc en faveur d'une participation de la PFK dans la régulation du métabolisme fermentaire en absence de multiplication cellulaire. Dans ces conditions, il faudrait toutefois s'attendre à une désinhibition partielle ou totale de cet enzyme par accumulation de F 6 P avec rétablissement du pouvoir fermentaire. Ceci implique nécessairement un deuxième mécanisme régulateur qui permet le contrôle du taux intracellulaire de F 6 P.

Or, nous avons vu que certains métabolites phosphorylés pourraient jouer un rôle important dans l'activation des systèmes hydrolytiques associés aux ribosomes.

Quoique nous ne possédions aucune preuve directe de la dégradation intracellulaire de l'hexokinase, il nous paraît pourtant significatif que la vitesse de fermentation et l'activité de l'hexokinase varient dans les mêmes proportions. D'autre part, l'actidione, qui inhibe ni l'activité des enzymes protéolytiques, ni celle des enzymes glycolytiques, entraîne non seulement une diminution de l'activité fermentaire mais

également celle de l'hexokinase.

En conclusion, les variations du métabolisme fermentaire pourraient s'expliquer par un mécanisme de contrôle où la diminution de l'activité de l'hexokinase résulterait de l'apparition d'un facteur limitant par inhibition allostérique de la PFK par l'ATP.

+ . + . + . + . + . +

R E S U M E

- 1) L'étude de la vitesse d'utilisation du maltose permet de classer les levures hautes (*S.cerevisiae*) en plusieurs groupes. Certaines souches fermentent constitutivement ce disaccharide, d'autres se caractérisent par une diminution plus ou moins rapide du pouvoir fermentaire sur maltose après croissance sur glucose.
 Dans la plupart des cas la vitesse d'utilisation du maltose reste appréciable même après cinq générations sur milieu glucosé. Ces résultats suggèrent soit l'absence de certains gènes régulateurs soit une modification de l'affinité de un ou de plusieurs gènes opérateurs pour le répresseur cytoplasmique correspondant.
 Les levures basses (*S.carlsbergensis*) forment un groupe homogène se caractérisant par un taux d'inhibition de 90% de l'activité de la maltozymase pour un accroissement de la masse cellulaire de 20% en présence de glucose.
- 2) Les conditions qui déterminent la répression de la synthèse de la maltozymase ont été précisées dans le cas d'une souche de *S. cerevisiae*. Des croissances effectuées en présence de différentes concentrations de glucose ont montré que la vitesse d'utilisation du maltose diminue à partir de $5.10^{-2}M$. Des concentrations plus faibles en glucose ($8.10^{-3}M$) permettent non seulement de maintenir la vitesse de fermentation à un taux élevé mais permettent également d'augmenter le pouvoir fermentaire après répression par le glucose 10%. Cet accroissement est parallèle à celui observé en présence de l'inducteur et est complètement inhibé par l'actidione ou par la p. fluorophénylalanine. Ces résultats nous permettent de conclure à une néosynthèse de protéines actives et à un rôle régulateur double du glucose. (répresseur et inducteur)

Ces résultats ont été confirmés par des déterminations du taux d'activité de l' α glucosidase après répression par le glucose 10% et après induction en présence de glucose 0,15%.

- 3) L'analyse des conditions qui déterminent les fluctuations de la vitesse de fermentation au cours du cycle de la croissance en anaérobiose, ont montré que celles-ci sont essentiellement liées aux variations cycliques de l'état physiologique des cellules.

Chaque période de croissance entraîne une stabilisation du pouvoir fermentaire et chaque période de fermentation en absence de multiplication cellulaire une diminution de l'efficience par cellule.

- 4) La perte partielle de la capacité fermentaire de la levure est réversible. Un prétraitement aérobie par un hydrolysât de caséine permet de rétablir la vitesse de fermentation à 80% de sa valeur initiale. Après irradiation des cellules dans l'ultraviolet l'hydrolysât de caséine s'avère sans effet.

- 5) Des déterminations du taux d'activité de l'hexokinase, de l'aldolase et de l' α glucosidase au cours du cycle de la croissance en anaérobiose ont montré que la vitesse de fermentation et l'activité de l'hexokinase varient dans les mêmes proportions. En présence d'actidione l'activité spécifique de l'hexokinase diminue considérablement. Dans ces mêmes conditions l'activité de l'aldolase et de l' α glucosidase ne varie pas.

Si ces résultats sont en faveur d'un mécanisme régulateur basé sur une activation des protéinases liées aux ribosomes, ils ne permettent toutefois pas d'exclure une inhibition éventuelle de certains enzymes de la glycolyse par une accumulation de métabolites (ATP) due à un arrêt ou à un ralentissement des processus biosynthétiques. L'inhibition allostérique de la phosphofructokinase par l'ATP a été envisagée.

B I B L I O G R A P H I E

-
- 1) ALBERTY R.A.: (1953) "J.Am.Chem.Soc." 75, 1928
 - 2) BARTON WRIGHT E.C.: (1953) "Wallerstein Lab.comm." 16
 - 3) BARTON WRIGHT E.C.: (1949) "Biochim.Biophys.Acta" 3, 679
 - 4) BECK W.S.: (1955) "J.Biol.Chem." 212, 847
 - 5) BLAKELEY E.R. & BOYER P.D.: (1955) "Biochim.Biophys.Acta" 16, 576
 - 6) BOLTON E.T., BRITTEN R.J., COWIE D.B., MC CARTHY B.J.,
MC QUILLAN R. & ROBERTS R.B.: (1959) "Carnegie Inst.Wash.
Yearbook" 58, 275
 - 7) BONNER D.M.: (ed.) (1961) "Control Mechanisms" The Ronald
Press C° New York
 - 8) BRADLEY S.G.: (1962) "Nature" 194, 315
 - 9) BRENNER S., JACOB F. & MISELSON M.: (1961) "Nature" 194, 315
 - 10) BRETHAVER R.K., MARCUS L. CHALOUPIKA J., HALVORSON H.O. &
BOCK R.N.: (1963) "Biochemistry" 2, 1079
 - 11) BROWN D.H.: (1951) "Biochim.Biophys. Acta" 7, 487
 - 12) BURGER M., BACON E.E. & BACON J.S.D.: (1961) "Biochem.J." 78, 504
 - 13) BURGER M., HEJMOVA & KLEINZELLER A.: (1959) "Biochem.J." 71,
233
 - 14) CHRISTIAN W.: (1955) "Meth. Enz.I" p. 315
 - 15) CIRILLO V.P.: (1961) "Am.Rev.Microbiol" 15, 197
 - 16) CIRILLO V.P.: (1959) "Bact.Proc." p.108
 - 17) COHEN G.N. & MONOD J.: (1957) "Bacteriol Rev." 21, 169
 - 18) COHEN G.N., HALVORSON H.O. & SPIEGELMAN S.: (1958) "Micro-
somal Particles and Protein Synthesis" Pergamon Press,
N.Y. London p. 100
 - 19) COHEN & HORIBATA K.: (1959) "Bacteriol" 78, 624
 - 20) COOK A.H. & PHILIPS A.W.: (1957) "Arch.Biochem.Biophys" 69, 1
 - 21) COWIE D.B., SPIEGELMAN S., ROBERTS R.B. & DUERKSEN: (1961)
"Proc.Natl.Acad.Sci. U.S." 47, 114
 - 22) CRAMER F.B. & WOODWARD G.E.: (1952) "J.Franklin Inst." 253,
354

- 23) CREASER E.H.: (1955) "J.Gen.Microbiol" 12, 228
- 24) CURTIS S. & WENHAM : (1958) "J.Inst.Brewing" 64, 421
- 25) DE LA FUENTE G & SOLS A.: (1962)"Biochim.Biophys.Acta"56,303
- 26) DE LA FUENTE G & SOLS A.: (1962)"Biochim.Biophys.Acta"56, 49
- 27) DUBOIS: (1951) "Nature" 168, 167
- 28) EADIE: (1952) "Science" 116, 2052
- 29) EMEIS C.C. & WINDISCH S.: (1960) "Z.Naturforschg." 15B, 702
- 30) ENGLESBERG E.: (1959) "Proc. Natl.Acad.Sci." 45, 1494
- 31) EPHRUSSI B. SLONIMSKI P.P., YOTSUYANAGI Y & TAVLITZKI J.C.R.:
(1956)"Compt.rend.Trav.Lab.Carlsberg Ser. Physiol."26, 87
- 32) FOWELL R.R.: (1952) "Nature" 170, 578
- 33)FRUS J. & OTTOLENGHI P.: (1959) "Compt.rend.Trav.Lab.Carls-
berg Ser. physiol." 31, 259
- 34) FURTH J.J., HURWITZ J. & GOLDMANN M. (1961) "Biochim.Bio-
phys. Research Comm." 4, 362
- 35) GEIDUSCHEK E.P., NAKAMOTO T. & WEISS S.B.: (1961) "Proc.
Natl.Acad.Sci." 47, 1411
- 36) GILLILAND R.B.: (1953) "Eur.Brew.Conv.Proc."(Nice) p.121
- 37) GILLILAND R.B.: (1954) "Nature" 173, 409
- 38) GJERTSEN P.: (1955) "Eur.Brew.Conv.Proc."(Baden Baden) p.37
- 39) GORINI L. & MAAS W.K.:(1957) "Biochim.Biophys.Acta" 25, 208
- 40) GOTTSCHALK A.: (1947) "Biochem.J." 41, 478
- 41) GOTTSCHALK A.: (1950) "J.B. SUMMER & K. MYRHACK - The Enzy-
mes" vol.I part. I Academie Press Inc. N.Y. p. 551
- 42) GREIG M.E., WALK R.A. & GIBBONS A.J.: (1958) "J.Bacteriol."
75, 489
- 43) GROS F., GILBERT W., HIATT H., KURLAND C., RISEBOROUGH R.W.
& WATSON J.D. (1961) "Nature" 190, 581
- 44) HABOUCHA J. ET MASSCHELEIN CH.A.: (1960) "Biochim.Biophys.
Acta" 38, 1
- 45) HABOUCHA J., MASSCHELEIN CH.A. & DEVREUX A.: (1960)
"Eur.Brew.Conv.Proc. (Rome) p. 157
- 46) HALL R.D., HARRIS G. et Mac WILLIAM I.C. (1951) "J.Inst.
Brewing" 264

- 47) HALVORSON H.O. & SPIEGELMAN S.: (1952) "J.Bacteriol" 64, 207
- 48) HALVORSON H.O. & JACKSON L.: (1956) "J.Gen.Microbiol" 14, 26
- 49) HALVORSON H.O. & ELLIAS L. : (1958) "Biochim. Biophys.Acta" 30, 28
- 50) HALVORSON H.O., WINDERMAN S. & GORMAN J.: (1963) "Biochim. Biophys.Acta" 67, 42
- 51) HALVORSON H.O.: (1962) "Amino Acid.Pools" Elsevier Publishing Co Amsterdam - N.Y. p. 646
- 52) HALVORSON H.O.: (1958) "Biochim. Biophys. Acta" 27, 255
- 53) HALVORSON H.O., FRY W. & SCHWEMMIN D.: (1955) "J.Gen.Physiol" 38, 549
- 54) HALVORSON H.O.: (1960) "Advanc. Enzymol." 22, 99
- 55) HALVORSON H.O. & COWIE D.B.: (1961) "Symposium on Membrane Transport and Metabolism" Publishing House of the Czechoslovak - Academy of Sciences Prague p. 479
- 56) HARRIS G. & THOMPSON C.C.: (1960) "J.Inst.Brewing" 66, 293
- 57) HARRIS G. & THOMPSON C.C.: (1961) "Biochim.Biophys.Acta" 52, 176
- 58) HARRIS G. & MILLIN D.J.: (1963) "Eur.Brew.Conv.Proc." (Bruxelles) p. 400
- 59) HARRIS G. BARTON-WRIGHT E.C. & CURTIS N.S. (1951) "J.Inst. Brewing" 57, 264
- 60) HARRIS G. & MILLIN D.J.: (1963) "Biochem.J." 88, 89
- 61) HUGE J.G., Mac QUILLAN A.M., CLINE A.L. & HALVORSON H.O. : (1961) "Biochim.Biophys.Research Comm." 5, 267
- 62) HAWTHORNE D.C.: (1958) "Heredity" 12, 273
- 63) HERMAN A. & HALVORSON H.O.: (1963) "J. Bacteriol" 85, 895
- 64) HERMAN A. & HALVORSON H.O.: (1963) "J. Bacteriol" 85, 901
- 65) HERZENBERG L.A.: (1959) "Biochim. Biophys.Acta" 31, 525
- 66) HOLZER H. & GOEDDE H.W.: (1957) "Biochem.Z." 329, 175
- 67) HESTRIN S. & LINDEGREN C.: (1952) "Arch.Biochem.Biophys." 38, 317
- 68) HUNTER F.E.: (1951) "Phosphorus Metabolism" Vol I Mc Elroy W.D. & Glass B. (Ed.) John Hopkins Press., Baltimore p. 312

- 69) JACOB F. & MONOD J.: (1961) "J.Mol.Biol." 3, 318
- 70) JACON F. & MONOD J.: (1961) "Cold Spring Harb.Symp." 26, 193
- 71) JACOB F., SUSSMAN R. & MONOD J.: (1962) "C.R. Acad.Sci." 254, 4214
- 72) JAGANNATHAN V. SINGH K. & DAMODARAN M.: (1956) "Biochem.J." 63, 94
- 73) JOHNSTON J.R. & MCRTIMER R.K.: (1959) "J.Bacteriol" 78, 292
- 74) JOHNSTON J.R.: (1963) "Eur.Brew.Conv.Proc." (Bruxelles) p. 412
- 75) KAJI A., TRAYSER K.A. et COLOWICK S.P.: (1961) "Am. N.Y. Acad.Sci." 94, 798
- 76) KERRIDGE : (1958) "J.Gen.Microbiol" 19, 497
- 77) KLEBER W. & HOFFMAN V.: (1954) "Brauwelt" 739
- 78) KOVAC : (1961) "Folia Microbiol" (Prague) 6, 311
- 79) KUNITZ M. & McDONALD M.R.: (1946) "J.Gen.Physiol" 29, 393
- 80) LEVIN A.P. & MAGASANIK B.: (1961) "J. Biol.Chem." 236, 1810
- 81) LINDEGREN C.C.: (1958) "Proc.Am.Soc.Brew.Chem." 86
- 82) LINEWEAVER & BURK : (1934) "J.Am.Chem.Soc." 56, 658
- 83) LINNANE A.W. & STILL J.L.: (1955) "Arch.Biochem" 59, 383
- 84) LOOMIS W.F. & MAGASANIK B.: (1964) "J.Mol.Biol." 8, 417
- 85) LOVELESS, SPOER L. & WEISSMAN : (1954) "J.Bacteriol" 68, 637
- 86) LOWRY OH, ROBERTS N.R., WIM, HIXON W.S. & CRAWFORD E.J. (1954) "J.Biol.Chem." 207, 19
- 87) LYNEN F.: (1963) "Control Mechanism in Respiration and Fermentation" The Ronald Press Co - New York p. 289.
- 88) LYNEN F., HARTMANN G, NETTER K.F. & SCHEUGRA F.A. (1959) dans "G.E.W. Wolstenholme et C.M. O'Connor (Ed.) "Ciba Foundation Symposium on Regulation of Cell Metabolism" - JJ et A. Churchill, London p. 256
- 89) Mac CLARY D.O., NULTY W.L. & MILLER G.P.: (1959) "J.Bacteriol" 78, 362
- 90) McFALL E. & MANDELSTAM J.: (1963) "Nature" 197, 880
- 91) MC FARLANE W.D., HELD H.R., JEGARD S. & BLINOFF G.: (1953) "Amer.Soc.Brew.Chem.Proc." 67, 78

- 92) McQUILLAN A.M., WINDERMAN S. & HALVORSON H.O.: (1960)
"Biochem.Biophys.Research.Comm." 2, 77
- 93) McQUILLAN A.M. & HALVORSON H.O.: (1962) "J.Bacteriol" 84, 23
- 94) McQUILLAN A.M. & HALVORSON H.O.: (1962) "J.Bacteriol" 84, 31
- 95) McQUILLAN A.M., WINDERMAN S. & HALVORSON H.O.: (1960)
"Bacteriol.Proc" p. 173
- 96) MAGASANIK B.: (1957) "ANN.REV.MICROBIOL" 11, 221
- 97) MAGASANIK B., NEIDHARDT F.C. & LEVIN A.P.: (1958)
"Physiological Adaptation" Ed. Prosset p.159
- 98) MAGASANIK B.: (1961) "Cold.Spring Harbor.Symp." 26, 249
- 99) MANDELSTAM J.: (1957) "Nature" 179, 1179
- 100) MANDELSTAM J.: (1961) "Biochem J." 79, 489
- 101) MANDELSTAM J.: (1958) "Biochem J." 69, 110
- 102) MANDELSTAM J.: (1954) "J.Gen.Microbiol" 11, 426
- 103) MANDELSTAM J.: (1960) "Bacteriol.Rev." 24, 289
- 104) MANSOUR T.E. & MANSOUR J.M.: (1962) "J.Biol.Chem." 237, 629
- 105) MARCUS L., BRETTHAUER R.K., BOCK R.M. & HALVORSON H.O.:
(1963) "Proc.Nat.Acad.Sci.U.S." 50, 782
- 106) MASSCHELEIN CH.A.: (1959) "Revue Des Fermentations et Inds.
Alimentaires" 14, 58 et 81.
- 107) MASSCHELEIN CH.A., RAMOS-JEUNEHOMME CL, CASTIAU M. & DEVREUX
A.: (1963) "J.Inst.Brewing" 69, 322
- 108) MASSCHELEIN CH.A. DUPONT J., RAMOS-JEUNEHOMME CL. & DEVREUX
A.: (1960) "J.Inst.Brewing" 66, 502
- 109) MILLIN D.J.: (1963) "J.Inst.Brewing" 69, 390
- 110) MONOD J. & JACOB F.: (1961) "Cold Spring Harbor Symp." 26,
389
- 111) MONOD J., CHANGEUX J.P. & JACOB F.: (1963) "J.Mol.Biol." 6
306
- 112) MONOD J. & BROWN J.R.: (1961) "Fed.Proc." 20, 222
- 113) MOYED H.S. & UMBARGER H.E.: (1962) "Physiol.Rev." 42, 444
- 114) NAKADA D. & MAGASANIK B.: (1964) "J.Mol.Biol." 8, 105
- 115) NEIDHARDT F.C. & MAGASANIK B.: (1956) "Biochim.Biophys.Acta"
21, 324
- 116) NEIDHARDT F.C. & MAGASANIK B.: (1957) "J.Bacteriol" 73, 253

- 117) NEIDHARDT F.C. & MAGASANIK B.: (1956) "Nature" 178, 801
- 118) NIRENBERG M.W. & MATTHAGI J.H.: (1962) "Proc.Natl.Acad. Sci.US." 47, 1558
- 119) NIRENBERG M.W. & MATTHAEI J.H. (1961) "Proc.Natl.Acad.Sci. U.S." 48, 104
- 120) NOSSAL P.M.: (1954) "Biochem.J." 57, 62
- 121) PASSONEAU J.V. & LOWRY O.H.: (1962) "Biochem. Biophys.Res. Comm." 7, 10
- 122) PETT L.B.: (1935) "Biochem J." 29, 937
- 123) PHILLIPS A.W.: (1955) "J.Inst.Brewing" 61, 122
- 124) RICHARDS & RUTTER : (1961) "J.Biol.Chem." 236, 3185
- 125) ROBERTSON J.J. & HALVORSON H.O.: (1957) "J.Bacteriol" 73, 186
- 126) ROHRER E.: (1953) "Schweiz Brau Rundsch." 64, 35
- 127) ROINE P.: (1947) "Ph. D. Thesis" - University of Helsinki
- 128) RUDERT F. & HALVORSON H.O.: (1963) "Bull. Res.Caunc.of Israë1" Vol. 11 A₄, 337
- 129) RUTTER : (1963) "J.Biol.Chem." 236, 3178
- 130) SCHNEIDER W.C.: (1955) "Proc.Intern.Congr.Biochem" 3e Congr. Academic Press New York p. 305
- 131) SIBLEY J.A. & LEHNINGER A.L.: (1949) "J.Biol.Chem." 177, 859
- 132) SIEGEL M.R. & SISLER H.D.: (1963) "Nature" 200, 675
- 133) SIMPSON M.V.: (1953) "J.Biol.Chem." 201, 143
- 134) SLONIMSKI P.: (1953) "La Formation des Enzymes respiratoires chez la Levure " - Masso - Paris p. 150
- 135) SOLS A.: (1956) "Biochim. Biophys.Acta" 20, 62
- 136) SOLS A. DE LA FUENTE G., VILLAR ASENSIO.: (1958) "Biochim. Biophys.Acta" 30, 92
- 137) SPAHR P.F. & HOLLINGWORTH B.R.: (1961) "J.Biol.Chem." 236, 823
- 138) SPIEGELMAN S., HALVORSON H.O. & BEN ISHAI: (1955) "Amino Acid Metabolism" John Hopkins - University Press, Baltimore p. 124
- 139) SPIEGELMAN S. & HALVORSON H.O.: (1954) "J.of Bacteriol" 68, 265
- 140) SPIEGELMAN S., REINER J.M. & COHNBERG R.: (1947) "J.Gen.Physiol" 31, 27

- 141) STEINBERG & VAUGHAN M.: (1956) "Biochim.Biophys.Acta" 19, 584
- 142) STENESH J.J.: (1958) "Thesis University of California-Berkeley."
- 143) STIER T.J.B. & MacINTYRE C.F.: (1942) "J.Cell.Comp.Physiol" 20, 385
- 144) STIER T.J.B. & SPRINCE H.S.: (1941) "J.Cell.Comp.Physiol." 18, 135
- 145) SUOMALAINEN H., AXELSON E. & AURA E.: (1956) "Biochim.Biophys.Acta" 20, 319
- 146) SUTTON D.D. & LAMPEN J.O.: (1962) "Biochim.Biophys.Acta" 56, 303
- 147) "SYMPOSIUM ON MULTIPLE FORMS OF ENZYME IN CONTROL MECHANISMS": (1963) II STADTMAN E.R.: "Enzyme Multiplicity and Function in the Regulation of Divergent Metabolic Pathways" p. 170
- 148) "Symp.Quant.Biol.Cold Spring Habor": (1961) Vol. 26
- 149) SWENSON P.A. & GIESE A.G.: (1950) "J.Cell.Comp.Physiol." 36, 369
- 150) TASHIRO Y.: (1958) "J. Biochem" 43, 937
- 151) TAYLOR & WHELAN: (1962) "Chem.and Ind." 44
- 152) TERUI & OKADA : (1951) "OSAKA UNIV. TECHNOL.REPTS" 1, 293
- 153) TERUI G., OKADA H. & OSHIMA Y.; (1959) "Osaka Univ.Technol. Repts" 9, 237
- 154) THORNE R.S.W.: (1962) "Colloque sur les Levures" (Paris) Fondation de la Brasserie et de la Malterie Française - Nancy p. 94
- 155) UMBREIT W.Y., BURRIS R.H. & STAUFFER: (1951) "Manometric Techniques and Tissue Metabolism", Burgess Publ. C° Minneapolis
- 156) VINUELA E., SALAS M.L & SOLS A.: (1963) "Biochem.Biophys. Research. Comm." 12, 140
- 157) VINUELA E. & SOLS A.: (1963) en préparation
- 158) WAINWRIGHT S.D. & POLLOCK M.R.: (1949) "Brit.J.Exp.Path." 30, 190
- 159) WARREN W. ET GOLDTWAIT D.: (1961) "Fed.Proc." 20, 114

- 160) WEISS S.B. & GLADSTONE L.: (1959) "J.Am.Chem.Soc." 81, 4118
- 161) WEISS S.B. (1960) "Proc. Natl.Acad.Sci." 46, 1020
- 162) WHIFFEN A.J.: (1948) "J.Bacteriol" 56, 283
- 163) WINDISCH S.: (1952) "Brauwerei" 6, 311
- 164) WINDISCH S.: (1962) "Colloque sur les levures" (Paris)
Fondation de la Brasserie et de la Malterie Française -
Nancy p. 63
- 165) WINGE O. et ROBERTS C.: (1948) "Compt.rend.Trav.Lab.Carls-
berg-Ser.physiol." 24, 263
- 166) WINGE O. et ROBERTS C.: (1950) "Compt.rend.Trav.Lab.Carls-
berg-Ser.physiol." 25, 35
- 167) WINGE O. et ROBERTS C.: (1956) "Nature" 177, 383
- 168) WINGE O. et ROBERTS C.: (1950) "Nature" 166, 1114
- 169) WINGE O, et ROBERTS C.: (1955) "Compt.rend.Trav.Lab.Carls-
berg-Ser.physiol." 25, 331
- 170) WINGE C. et ROBERTS C.: (1952) "Compt.Rend.Trav.Lab.Carls-
berg-Ser.physiol." 25, 141

+ . + . + . + . + . +

DEUXIEME THESE

Proposition donnée par la Faculté

CONTRIBUTION A L' ETUDE DU METABOLISME

OXYDATIF CHEZ

SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS

+ . + . + . + . + . + . +

Vu et approuvé,
Nancy, le

Le Doyen de la Faculté des
Sciences

J. AUBRY

Vu et permis d'imprimer
Nancy, le

Le Recteur,
Président du Conseil de
l'Université de Nancy

P. IMBS

